

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 04 April 2001 (04.04.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 3-1, Kasumigaseki 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-0013 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input checked="" type="checkbox"/> the name <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address JAPAN as represented by DIRECTOR- GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, MINISTRY OF ECONOMY, TRADE AND INDUSTRY 3-1, Kasumigaseki 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-0013 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  Susumu Kubo
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 04 April 2001 (04.04.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input checked="" type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address YOSHIDA, Mikiko National Institute of Materials and Chemical Research, Agency of Industrial Science and Technology 1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address YOSHIDA, Mikiko National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry National Institute of Materials and Chemical Research 1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35		Authorized officer Susumu Kubo Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

## NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 04 April 2001 (04.04.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input checked="" type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address UENO, Katsuhiko National Institute of Materials and Chemical Research, Agency of Industrial Science and Technology 1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address UENO, Katsuhiko National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry National Institute of Materials and Chemical Research 1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Susumu Kubo Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 04 April 2001 (04.04.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input checked="" type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent
<input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address OHNISHI, Noriyuki National Institute of Materials and Chemical Research, Agency of Industrial Science and Technology 1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input checked="" type="checkbox"/> the address
<input type="checkbox"/> the nationality		
<input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address OHNISHI, Noriyuki National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry National Institute of Materials and Chemical Research 1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35		Authorized officer Susumu Kubo Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 13 December 2001 (13.12.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address JAPAN as represented by DIRECTOR- GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, MINISTRY OF ECONOMY, TRADE AND INDUSTRY 3-1, Kasumigaseki 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-0013 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 3-1, Kasumigaseki 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-8921 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35		Authorized officer Susumu KUBO Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 13 December 2001 (13.12.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input checked="" type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address OHNISHI, Noriyuki National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry National Institute of Materials and Chemical Research 1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address OHNISHI, Noriyuki Chisso Corporation Yokohama Research Center 5-1, Okawa Kanazawa-ku Yokohama-shi Kanagawa 236-8605 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35		Authorized officer Susumu KUBO Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 13 December 2001 (13.12.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input checked="" type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address YOSHIDA, Mikiko National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry National Institute of Materials and Chemical Research 1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address YOSHIDA, Mikiko 10-18, Hanabatake 2-chome Tsukuba-shi Ibaraki 300-3261 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35		Authorized officer Susumu KUBO Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 13 December 2001 (13.12.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	
International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)	

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input checked="" type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address UENO, Katsuhiko National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry National Institute of Materials and Chemical Research 1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address UENO, Katsuhiko National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Tsukuba Center 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8561 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Susumu KUBO  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 29 March 2001 (29.03.01)	
<b>International application No.</b> PCT/JP00/05113	<b>Applicant's or agent's file reference</b> P-35490
<b>International filing date</b> (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 29 July 1999 (29.07.99)
<b>Applicant</b> OHNISHI, Noriyuki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

13 February 2001 (13.02.01)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Kiwa Mpay

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	受理番号記入欄
国際出願日	PCT 2000.7.1 受領
(受付印)	
出願人又は代理人の登録番号 (希望する場合、最大12字)	P-35490

第 I 欄 発明の名称

重合性ビオチン誘導体、ビオチン高分子化合物及びアビジン刺激応答性高分子化合物

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

工業技術院長が代表する日本国  
JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR GENERAL OF  
AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY  
〒100-0013 日本国東京都千代田区霞が関一丁目3番1号  
3-1, Kasumigaseki 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013  
J A P A N

☐ この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

財団法人 化学技術戦略推進機構  
JAPAN CHEMICAL INNOVATION INSTITUTE  
〒111-0052 日本国東京都台東区柳橋二丁目22番13号  
22-13, Yanagibashi 2-chome, Taito-ku, Tokyo 111-0052 JAPAN

この欄に記載した者は  
次に該当する:

☒ 出願人のみである。

☐ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
(ここにシ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が提案に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

弁理士 (10564) 小栗 昌平 OGURI Shohei  
弁理士 (10547) 本多 弘徳 HONDA Hironori  
弁理士 (10858) 市川 利光 ICHIKAWA Toshimitsu  
弁理士 (11510) 高松 猛 TAKAMATSU Takeshi  
弁理士 (9034) 栗宇百合子 KURIU Yuriko  
〒107-6028 日本国東京都港区赤坂一丁目12番32号  
アーク森ビル28階 栄光特許事務所  
Eikoh Patent Office, 28th Floor, ARK Mori Building,  
12-32, Akasaka 1-chome, Minato-ku, Tokyo 107-6028 JAPAN

電話番号:

03-5561-3990

ファクシミリ番号:

03-5561-3995

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、シ印を付す。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 第III欄の続き その他の出願人又は発明者

この欄を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載: 法人は公式の完全な名称を記載: あて名は郵便番号及び国名も記載)

大西 徳幸 OHNISHI Noriyuki  
〒305-0046 日本国茨城県つくば市東一丁目1番地  
工業技術院物質工学工業技術研究所内  
c/o  
NATIONAL INSTITUTE OF MATERIALS AND CHEMICAL RESEARCH,  
AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載: 法人は公式の完全な名称を記載: あて名は郵便番号及び国名も記載)

吉田 三喜子 YOSHIDA Mikiko  
〒305-0046 日本国茨城県つくば市東一丁目1番地  
工業技術院物質工学工業技術研究所内  
c/o  
NATIONAL INSTITUTE OF MATERIALS AND CHEMICAL RESEARCH,  
AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載: 法人は公式の完全な名称を記載: あて名は郵便番号及び国名も記載)

片岡 一則 KATAOKA Kazunori  
〒113-0033 日本国東京都文京区本郷七丁目3番1号  
東京大学大学院工学系研究科内  
c/o GRADUATE SCHOOL OF ENGINEERING, THE UNIVERSITY OF TOKYO,  
3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku, TOKYO 113-0033 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載: 法人は公式の完全な名称を記載: あて名は郵便番号及び国名も記載)

上野 勝彦 UENO Katsuhiko  
〒305-0046 日本国茨城県つくば市東一丁目1番地  
工業技術院物質工学工業技術研究所内  
c/o  
NATIONAL INSTITUTE OF MATERIALS AND CHEMICAL RESEARCH,  
AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の欄に記載されている。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 第3 V 欄 国の指定

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う(該当する□にレ印を付すこと; 少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

## 広域半島

- ☐ **AP** **ARIPPO** 半島: **GH** ガーナ Ghana, **GM** ガンビア Gambia, **KE** ケニア Kenya, **LS** レソト Lesotho, **MW** マラウイ Malawi, **SD** スーダン Sudan, **SL** シェラ・レオネ Sierra Leone, **SZ** スワジランド Swaziland, **TZ** タンザニア United Republic of Tanzania, **UG** ウガンダ Uganda, **ZW** ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ **EA** ユーラシア半島: **AM** アルメニア Armenia, **AZ** アゼルバイジャン Azerbaijan, **BY** ベラルーシ Belarus, **KG** キルギス Kyrgyzstan, **KZ** カザフスタン Kazakhstan, **MD** モルドヴァ Republic of Moldova, **RU** ロシア Russian Federation, **TJ** タジキスタン Tajikistan, **TM** トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ **EP** ヨーロッパ半島: **AT** オーストリア Austria, **BE** ベルギー Belgium, **CH** and **LI** スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, **CY** キプロス Cyprus, **DE** ドイツ Germany, **DK** デンマーク Denmark, **ES** スペイン Spain, **FI** フィンランド Finland, **FR** フランス France, **GB** 英国 United Kingdom, **GR** ギリシャ Greece, **IE** アイルランド Ireland, **IT** イタリア Italy, **LU** ルクセンブルグ Luxembourg, **MC** モナコ Monaco, **NL** オランダ Netherlands, **PT** ポルトガル Portugal, **SE** スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ **OA** **OAPI** 半島: **BF** ブルキナ・ファソ Burkina Faso, **BJ** ベナン Benin, **CF** 中央アフリカ Central African Republic, **CG** コンゴ Congo, **CI** コートジボアール Côte d'Ivoire, **CM** カメルーン Cameroon, **GA** ガボン Gabon, **GN** ギニア Guinea, **GW** ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, **ML** マリ Mali, **MR** モリタニア Mauritania, **NE** ニジェール Niger, **SN** セネガル Senegal, **TD** チャード Chad, **TG** トーゴ Togo, 及びアフリカ知的財産機構のメンバー国と特許協力条約の締結国である他の国 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

## 国 内 半島 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> <b>AE</b> アラブ首長国連邦 United Arab Emirates                       | <input type="checkbox"/> <b>LR</b> リベリア Liberia  |
| <input type="checkbox"/> <b>AL</b> アルバニア Albania                                       | <input type="checkbox"/> <b>LS</b> レソト Lesotho   |
| <input type="checkbox"/> <b>AM</b> アルメニア Armenia                                       | <input type="checkbox"/> <b>LT</b> リトアニア Lithuania   |
| <input type="checkbox"/> <b>AT</b> オーストリア Austria                                      | <input type="checkbox"/> <b>LU</b> ルクセンブルグ Luxembourg  |
| <input type="checkbox"/> <b>AU</b> オーストラリア Australia                                   | <input type="checkbox"/> <b>LV</b> ラトヴィア Latvia  |
| <input type="checkbox"/> <b>AZ</b> アゼルバイジャン Azerbaijan                                 | <input type="checkbox"/> <b>MA</b> モロッコ Morocco  |
| <input type="checkbox"/> <b>BA</b> ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina                | <input type="checkbox"/> <b>MD</b> モルドヴァ Republic of Moldova                                   |
|  | <input type="checkbox"/> <b>MG</b> マダガスカル Madagascar   |
|  | <input type="checkbox"/> <b>MK</b> マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> <b>BB</b> バルバドス Barbados                                      | <input type="checkbox"/> <b>MN</b> モンゴル Mongolia   |
| <input type="checkbox"/> <b>BG</b> ブルガリア Bulgaria                                      | <input type="checkbox"/> <b>MW</b> マラウイ Malawi   |
| <input type="checkbox"/> <b>BR</b> ブラジル Brazil   | <input type="checkbox"/> <b>MX</b> メキシコ Mexico   |
| <input type="checkbox"/> <b>BY</b> ベラルーシ Belarus                                       | <input type="checkbox"/> <b>NO</b> ノルウェー Norway  |
| <input type="checkbox"/> <b>CA</b> カナダ Canada  | <input type="checkbox"/> <b>NZ</b> ニュー・ジーランド New Zealand                                       |
| <input type="checkbox"/> <b>CH and LI</b> スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> <b>PL</b> ポーランド Poland  |
| <input type="checkbox"/> <b>CN</b> 中国 China  | <input type="checkbox"/> <b>PT</b> ポルトガル Portugal  |
| <input type="checkbox"/> <b>CR</b> コスタリカ Costa Rica                                    | <input type="checkbox"/> <b>RO</b> ルーマニア Romania   |
| <input type="checkbox"/> <b>CU</b> キューバ Cuba   | <input type="checkbox"/> <b>RU</b> ロシア Russian Federation                                      |
| <input type="checkbox"/> <b>CZ</b> チェッコ Czech Republic                                 | <input type="checkbox"/> <b>SD</b> スーダン Sudan  |
| <input type="checkbox"/> <b>DE</b> ドイツ Germany   | <input type="checkbox"/> <b>SE</b> スウェーデン Sweden   |
| <input type="checkbox"/> <b>DK</b> デンマーク Denmark                                       | <input type="checkbox"/> <b>SG</b> シンガポール Singapore  |
| <input type="checkbox"/> <b>DM</b> ドミニカ Dominica                                       | <input type="checkbox"/> <b>SI</b> スロヴェニア Slovenia   |
| <input type="checkbox"/> <b>EE</b> エストニア Estonia                                       | <input type="checkbox"/> <b>SK</b> スロヴァキア Slovakia   |
| <input type="checkbox"/> <b>ES</b> スペイン Spain  | <input type="checkbox"/> <b>SL</b> シェラ・レオネ Sierra Leone  |
| <input type="checkbox"/> <b>FI</b> フィンランド Finland                                      | <input type="checkbox"/> <b>TJ</b> タジキスタン Tajikistan   |
| <input type="checkbox"/> <b>GB</b> 英国 United Kingdom                                   | <input type="checkbox"/> <b>TM</b> トルクメニスタン Turkmenistan                                       |
| <input type="checkbox"/> <b>GD</b> グレナダ Grenada  | <input type="checkbox"/> <b>TR</b> トルコ Turkey  |
| <input type="checkbox"/> <b>GE</b> グルジア Georgia  | <input type="checkbox"/> <b>TT</b> トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago                              |
| <input type="checkbox"/> <b>GH</b> ガーナ Ghana   | <input type="checkbox"/> <b>TZ</b> タンザニア United Republic of Tanzania                           |
| <input type="checkbox"/> <b>GM</b> ガンビア Gambia   | <input type="checkbox"/> <b>UA</b> ウクライナ Ukraine   |
| <input type="checkbox"/> <b>HR</b> クロアチア Croatia                                       | <input type="checkbox"/> <b>UG</b> ウガンダ Uganda   |
| <input type="checkbox"/> <b>HU</b> ハンガリー Hungary                                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> 米国 United States of America                      |
| <input type="checkbox"/> <b>ID</b> インドネシア Indonesia                                    |  |
| <input type="checkbox"/> <b>IL</b> イスラエル Israel  | <input type="checkbox"/> <b>UZ</b> ウズベキスタン Uzbekistan  |
| <input type="checkbox"/> <b>IN</b> インド India   | <input type="checkbox"/> <b>VN</b> ヴィエトナム Viet Nam   |
| <input type="checkbox"/> <b>IS</b> アイスランド Iceland                                      | <input type="checkbox"/> <b>YU</b> ユーゴスラヴィア Yugoslavia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> 日本 Japan                                 | <input type="checkbox"/> <b>ZA</b> 南アフリカ共和国 South Africa                                       |
| <input type="checkbox"/> <b>KE</b> ケニア Kenya   | <input type="checkbox"/> <b>ZW</b> ジンバブエ Zimbabwe  |
| <input type="checkbox"/> <b>KG</b> キルギス Kyrgyzstan                                     |  |
| <input type="checkbox"/> <b>KP</b> 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea           |  |
| <input type="checkbox"/> <b>KR</b> 韓国 Republic of Korea                                |  |
| <input type="checkbox"/> <b>KZ</b> カザフスタン Kazakhstan                                   |  |
| <input type="checkbox"/> <b>LC</b> セント・ルシア Saint Lucia                                 |  |
| <input type="checkbox"/> <b>LK</b> スリ・ランカ Sri Lanka                                    |  |

下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締結国となった国を指定するためのものである

指定の承認の宣言: 出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が承認を条件としていること、並びに優先日から15日が経過する前にその承認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。(指定の承認(料金を含む)は、優先日から15日以内に受理官庁へ提出しなければならない。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

第VI欄 優先権主張 <input type="checkbox"/> 他の優先権の主張（元の出願）が追記欄に記載されている				
元の出願日 (日、月、年)	元の出願番号	元の出願		
		国内出願：国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 29.07.99	平成11年特許願 第 215667号	日本国 J A P A N		
(2)				
(3)				

☒ 上記( )の番号の元の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の( )の番号のものについては、出願書類の認証様本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本特許庁の長官）に対して請求している。 (1)

\*元の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その元の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関	
国際調査機関（ISA）の選択	先の調査結果の利用請求：当該調査の照会（元の出願が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）
ISA / J P	出願日（日、月、年） 出願番号 国名（又は広域官庁）

第VIII欄 照会欄：出願の言語	
この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。	この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。
願書 ..... 4 枚	1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙
明細書（配列表を除く）..... 35 枚	2. <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
請求の範囲 ..... 3 枚	3. <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口頭への振込みを証明する書面
要約書 ..... 1 枚	4. <input type="checkbox"/> 別紙の記名押印された委任状
図面 ..... 枚	5. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し
明細書の配列表 ..... 枚	6. <input type="checkbox"/> 記名押印（署名）の説明書
合 計 43 枚	7. <input type="checkbox"/> 優先権書類（上記第VI欄の( )の番号を記載する）
	8. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）
	9. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
	10. <input type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク）
	11. <input type="checkbox"/> その他（書類名を詳細に記載する）

要約書とともに提示する図面： 本国際出願の使用言語名： 日 本 語

第IX欄 発明者の記名押印	
各人の氏名（名作）を記載し、その次に押印する。	
小 栗 昌 平	市 川 利 光
本 多 弘 徳	高 松 猛
	栗 宇 百 合 子

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日		2. 図面	
3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）		<input type="checkbox"/> 受理された	
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日		<input type="checkbox"/> 不足図面がある	
5. 出願人により特定された 国際調査機関	ISA / J P	6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に 調査用写しを送付していない	

第X欄 国際事務局（PCT）の記入欄	
記録原本の受理の日	
様式PCT/RO/101（最終用紙）（1993年7月：再版2000年1月）	

**THIS PAGE BLANK (UCB77)**



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 04 April 2001 (04.04.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant      ☐ the inventor      ☐ the agent      ☐ the common representative

Name and Address JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 3-1, Kasumigaseki 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-0013 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person      ☒ the name      ☐ the address      ☐ the nationality      ☐ the residence

Name and Address JAPAN as represented by DIRECTOR- GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, MINISTRY OF ECONOMY, TRADE AND INDUSTRY 3-1, Kasumigaseki 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-0013 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office      ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority      ☒ the elected Offices concerned  
☒ the International Preliminary Examining Authority      ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Susumu Kubo Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTC)**



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 04 April 2001 (04.04.01)	
Applicant's or agent's file reference P-35490	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input checked="" type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address YOSHIDA, Mikiko National Institute of Materials and Chemical Research, Agency of Industrial Science and Technology 1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address YOSHIDA, Mikiko National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry National Institute of Materials and Chemical Research 1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Susumu Kubo
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 04 April 2001 (04.04.01)	
Applicant's or agent's file reference P-35490	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address UENO, Katsuhiko National Institute of Materials and Chemical Research, Agency of Industrial Science and Technology 1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address UENO, Katsuhiko National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry National Institute of Materials and Chemical Research 1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned  
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Susumu Kubo Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

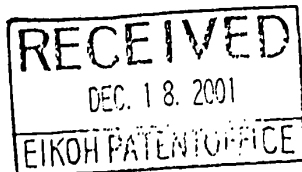
Date of mailing (day/month/year) 04 April 2001 (04.04.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input checked="" type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address OHNISHI, Noriyuki National Institute of Materials and Chemical Research, Agency of Industrial Science and Technology 1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address OHNISHI, Noriyuki National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry National Institute of Materials and Chemical Research 1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Susumu Kubo
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY



PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 13 December 2001 (13.12.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant      ☐ the inventor      ☐ the agent      ☐ the common representative

## Name and Address

JAPAN as represented by DIRECTOR-  
GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF  
ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND  
TECHNOLOGY, MINISTRY OF ECONOMY,  
TRADE AND INDUSTRY  
3-1, Kasumigaseki 1-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-0013  
Japan

## State of Nationality

JP

## State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person      ☐ the name      ☐ the address      ☐ the nationality      ☐ the residence

## Name and Address

NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED  
INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY  
3-1, Kasumigaseki 1-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8921  
Japan

## State of Nationality

JP

## State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office      ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority      ☒ the elected Offices concerned  
☐ the International Preliminary Examining Authority      ☐ other:

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

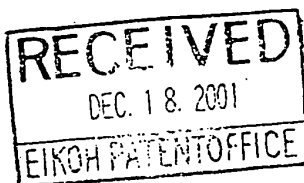
Authorized officer

Susumu KUBO

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY



PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 13 December 2001 (13.12.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant      ☒ the inventor      ☐ the agent      ☐ the common representative

## Name and Address

OHNISHI, Noriyuki  
National Institute of Advanced  
Industrial Science and Technology,  
Ministry of Economy, Trade and  
Industry National Institute of  
Materials and Chemical Research  
1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi,  
Ibaraki 305-0046  
Japan

## State of Nationality

JP

## State of Residence

JP

## Telephone No.

## Facsimile No.

## Teleprinter No.

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person      ☐ the name      ☒ the address      ☐ the nationality      ☐ the residence

## Name and Address

OHNISHI, Noriyuki  
Chisso Corporation  
Yokohama Research Center  
5-1, Okawa  
Kanazawa-ku  
Yokohama-shi  
Kanagawa 236-8605  
Japan

## State of Nationality

JP

## State of Residence

JP

## Telephone No.

## Facsimile No.

## Teleprinter No.

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office      ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority      ☒ the elected Offices concerned  
☐ the International Preliminary Examining Authority      ☐ other:

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

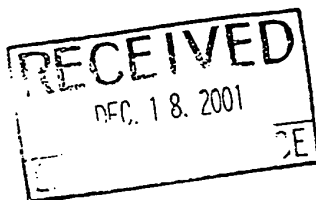
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Susumu KUBO

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 13 December 2001 (13.12.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant      ☒ the inventor      ☐ the agent      ☐ the common representative

Name and Address YOSHIDA, Mikiko National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry National Institute of Materials and Chemical Research 1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person      ☐ the name      ☒ the address      ☐ the nationality      ☐ the residence

Name and Address YOSHIDA, Mikiko 10-18, Hanabatake 2-chome Tsukuba-shi Ibaraki 300-3261 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 3. Further observations, if necessary:

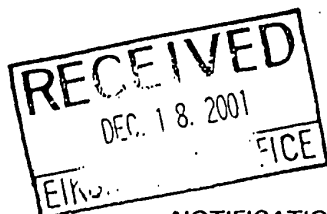
## 4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office      ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority      ☒ the elected Offices concerned  
☐ the International Preliminary Examining Authority      ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Susumu KUBO Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY



PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 13 December 2001 (13.12.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P-35490	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant      ☒ the inventor      ☐ the agent      ☐ the common representative

Name and Address UENO, Katsuhiko National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry National Institute of Materials and Chemical Research 1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0046 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person      ☐ the name      ☒ the address      ☐ the nationality      ☐ the residence

Name and Address UENO, Katsuhiko National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Tsukuba Center 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8561 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

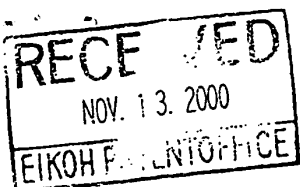
## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office      ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority      ☒ the elected Offices concerned  
☐ the International Preliminary Examining Authority      ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Susumu KUBO Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

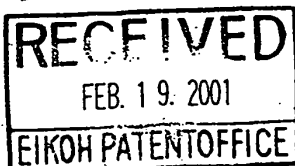
Date of mailing (day/month/year) 03 November 2000 (03.11.00)	
Applicant's or agent's file reference P-35490	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 29 July 1999 (29.07.99)
Applicant JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
29 July 1999 (29.07.99)	11/215667	JP	12 Sept 2000 (12.09.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer S. Mandallaz
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei  
Eikoh Patent Office  
ARK Mori Building, 28th Floor  
12-32, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-6028  
JAPON

## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year) 08 February 2001 (08.02.01)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference P-35490			
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)	Priority date (day/month/year) 29 July 1999 (29.07.99)	
Applicant JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
EP,JP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on  
08 February 2001 (08.02.01) under No. WO 01/09141

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3T  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P-35490	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)	Priority date (day/month/year) 29 July 1999 (29.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07D 495/04, C08F 20/54, 20/38, C12N 11/08		
Applicant JAPAN as represented by DIRECTOR-GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, MINISTRY OF ECONOMY, TRADE AND INDUSTRY		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 13 February 2001 (13.02.01)	Date of completion of this report 24 May 2001 (24.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05113

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/05113

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	5-12	YES
	Claims	1-4	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

- Document 1: Tarasow, T. et al., "Characteristics of an RNA Diels-Alderase Active Site," Journal of the American Chemical Society, Vol. 121, No. 15 (received by Japan Science and Technology Corp. in April 1999), pp. 3614-3617, Table 1, Substrate 9
- Document 2: Nelson, P. et al., "Convenient preparation of new C-5 biotinylated dUTP derivative," Nucleosides Nucleotides, Vol. 5, No. 3 (1986), pp. 233-241, Scheme 1, Substrate 3
- Document 3: WO, 86/1899, A1 (Unilever PLC), 27 March 1986 (27.03.86), entire document, esp. p. 11, lines 2-4, also EP, 178790, A1 and JP, 62-500198, A
- Document 4: EP, 226470, A2 (Unilever PLC), 24 June 1987 (24.06.87), also JP, 62-156561, A
- Document 5: EP, 914835, A2 (Alomone Labs Ltd.), 12 May 1999 (12.05.99), entire document, p. 5, lines 47-52 (Family: none)
- Document 6: JP, 2-96581, A (Shiseido Co., Ltd.), 9 April 1990 (09.04.90), Table II
- Document 7: US, 5863748, A (New Life Science Products, Inc.), 26 January 1999 (26.01.99) (Family: none)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/JP 00/05113

- Document 8: WO, 95/31730, A1 (Microscreen Corp.), 23 November 1995 (23.11.95), entire document, esp. Example 6 and Example 8, also US, 5750357, A
- Document 9: EP, 11777, A1 (F. Hoffmann-La Roche AG), 11 June 1980 (11.06.80), also US, 4245104, A
- Document 10: EP, 922715, A2 (Agency of Industrial Science and Technology MITI; Japan Chemical Innovation Institute), 16 June 1999 (16.06.99), also JP, 11-171928, A2
- Document 11: JP, 9-49830, A (Terumo Corp.), 18 February 1997 (18.02.97) (Family: none)
- Document 12: WO, 97/329, A (Yeda Research and Development Co., Ltd.), 3 January 1997 (03.01.97), also EP, 871658, A and JP, 11-507920, A
- Document 13: WO, 96/4402, A1 (The Regents of the University of California), 15 February 1996 (15.02.96), also US, 5582985, A and JP, 10-503655, A and EP, 774013, A

**Explanation**

**Claims 1 and 2**

Documents 1 to 10 disclose examples of the compounds described in Claims 1 and 2. Therefore, the inventions described in Claims 1 and 2 are features disclosed in Documents 1 to 10 and are not novel.

**Claims 3 and 4**

Documents 3, 4, 5, 7, 8, and 10 disclose the manufacture of macromolecular compounds with the aforementioned compounds as polymer ingredients or copolymer ingredients. Therefore, the inventions described in Claims 3 and 4 are features disclosed in Documents 3, 4, 5, 7, 8, and 10 and are not novel.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/JP 00/05113

Claims 5 to 12

It would be obvious to a person skilled in the art to use biotin-like substances disclosed in Documents 3, 4, 5, 7, 8, and 10 as a substitute for the biotin used in various known macromolecular compounds and/or base materials such as those disclosed in Documents 11 to 13. Therefore, the inventions described in Claims 5 to 12 do not involve an inventive step in the light of features disclosed on Documents 3, 4, 7, 8, 10, and 11 to 13.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05113

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO, 99/64378, A1 [E, X]	16 December 1999 (16.12.1999)	10 June 1999 (10.06.1999)	10 June 1998 (10.06.1998)

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

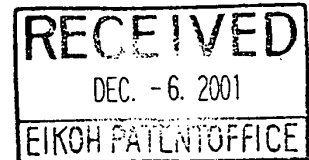
3T.  
**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)



Applicant's or agent's file reference P-35490	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/05113	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)	Priority date (day/month/year) 29 July 1999 (29.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07D 495/04, C08F 20/54, 20/38, C12N 11/08		
Applicant JAPAN as represented by DIRECTOR-GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, MINISTRY OF ECONOMY, TRADE AND INDUSTRY		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 13 February 2001 (13.02.01)	Date of completion of this report 24 May 2001 (24.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05113

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

 International application No.  
 PCT/JP 00/05113

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	5-12	YES
	Claims	1-4	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

- Document 1: Tarasow, T. et al., "Characteristics of an RNA Diels-Alderase Active Site," Journal of the American Chemical Society, Vol. 121, No. 15 (received by Japan Science and Technology Corp. in April 1999), pp. 3614-3617, Table 1, Substrate 9
- Document 2: Nelson, P. et al., "Convenient preparation of new C-5 biotinylated dUTP derivative," Nucleosides Nucleotides, Vol. 5, No. 3 (1986), pp. 233-241, Scheme 1, Substrate 3
- Document 3: WO, 86/1899, A1 (Unilever PLC), 27 March 1986 (27.03.86), entire document, esp. p. 11, lines 2-4, also EP, 178790, A1 and JP, 62-500198, A
- Document 4: EP, 226470, A2 (Unilever PLC), 24 June 1987 (24.06.87), also JP, 62-156561, A
- Document 5: EP, 914835, A2 (Alomone Labs Ltd.), 12 May 1999 (12.05.99), entire document, p. 5, lines 47-52 (Family: none)
- Document 6: JP, 2-96581, A (Shiseido Co., Ltd.), 9 April 1990 (09.04.90), Table II
- Document 7: US, 5863748, A (New Life Science Products, Inc.), 26 January 1999 (26.01.99) (Family: none)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/05113

- Document 8: WO, 95/31730, A1 (Microscreen Corp.), 23 November 1995 (23.11.95), entire document, esp. Example 6 and Example 8, also US, 5750357, A
- Document 9: EP, 11777, A1 (F. Hoffmann-La Roche AG), 11 June 1980 (11.06.80), also US, 4245104, A
- Document 10: EP, 922715, A2 (Agency of Industrial Science and Technology MITI; Japan Chemical Innovation Institute), 16 June 1999 (16.06.99), also JP, 11-171928, A2
- Document 11: JP, 9-49830, A (Terumo Corp.), 18 February 1997 (18.02.97) (Family: none)
- Document 12: WO, 97/329, A (Yeda Research and Development Co., Ltd.), 3 January 1997 (03.01.97), also EP, 871658, A and JP, 11-507920, A
- Document 13: WO, 96/4402, A1 (The Regents of the University of California), 15 February 1996 (15.02.96), also US, 5582985, A and JP, 10-503655, A and EP, 774013, A

Explanation

Claims 1 and 2

Documents 1 to 10 disclose examples of the compounds described in Claims 1 and 2. Therefore, the inventions described in Claims 1 and 2 are features disclosed in Documents 1 to 10 and are not novel.

Claims 3 and 4

Documents 3, 4, 5, 7, 8, and 10 disclose the manufacture of macromolecular compounds with the aforementioned compounds as polymer ingredients or copolymer ingredients. Therefore, the inventions described in Claims 3 and 4 are features disclosed in Documents 3, 4, 5, 7, 8, and 10 and are not novel.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/05113

Claims 5 to 12

It would be obvious to a person skilled in the art to use biotin-like substances disclosed in Documents 3, 4, 5, 7, 8, and 10 as a substitute for the biotin used in various known macromolecular compounds and/or base materials such as those disclosed in Documents 11 to 13. Therefore, the inventions described in Claims 5 to 12 do not involve an inventive step in the light of features disclosed on Documents 3, 4, 7, 8, 10, and 11 to 13.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05113

## VI. Certain documents cited

## 1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO, 99/64378, A1 [E, X]	16 December 1999 (16.12.1999)	10 June 1999 (10.06.1999)	10 June 1998 (10.06.1998)

## 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>
---------------------------------------	--	--



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 08 JUN 2001

WIPO

PCT

4T

出願人又は代理人 の書類記号 P-35490	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05113	国際出願日 (日.月.年) 28.07.00	優先日 (日.月.年) 29.07.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C07D495/04, C08F20/54, C08F20/38, C12N11/08		
出願人 (氏名又は名称) 経済産業省産業技術総合研究所長が代表する日本国		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第60.7号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☒ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 13.02.01	国際予備審査報告を作成した日 24.05.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  田村 聖子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 9051

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲	5-12	有
請求の範囲	1-4	無

進歩性(IS)

請求の範囲		有
請求の範囲	1-12	無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲	1-12	有
請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1 Tarasow T. et. al., "Characteristics of an RNA Diels-Alderase Active Site.", J. Am. Chem. Soc., Vol. 121, No. 15(1999年4月科学技术振興事業団受け入れ)P. 3614-3617, Table 1 Substrate 9

文献2 NELSON P. et. al., "Convenient preparation of new C-5 biotinylated d UTP derivative.", Nucleosides Nucleotides, Vol. 5, No. 3(1986) P. 233-241, SCHEME I Substrate 3

文献3 WO, 86/1899, A1(Unilever PLC)27. 3月. 1986(27. 03. 86)whole document, especially P. 11, Lines 2-4 & EP, 178790, A1 & JP, 62-500198, A

文献4 EP, 226470, A2(Unilever PLC)24. 6月. 1987(24. 06. 87) & JP, 62-156561, A

文献5 EP, 914835, A2(Alomone Labs Ltd.)12. 5月. 1999(12. 05. 99)Whole Document P. 5, Lines 47-52 (No Family)

文献6 JP, 2-96581, A(株式会社 資生堂)9. 4月. 1990(09. 04. 90)表II

文献7 US, 5863748, A(New Life Science Products, Inc.)26. 1月. 1999(26. 01. 99) (No Family)

文献8 WO, 95/31730, A1(Microscreen Corp.)23. 11月. 1995(23. 11. 95)Whole Document, especially Example 6 & Example 8 & US, 5750357, A

文献9 EP, 11777, A1(Hoffmann-La Roche, F., und Co. A.-G.)11. 6月. 1980(11. 06. 80) & US, 4245104, A

文献10 EP, 922715, A2(Agency of Industrial Science and Technology MITI; Japan Chemical Innovation Institute)16. 6月. 1999(16. 06. 99) & JP, 11-171928, A2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 99/64378, A1 [E, X]	16. 12月. 1999 (16. 12. 99)	10. 6月. 1999 (10. 06. 99)	10. 6月. 1998 (10. 06. 98)

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

文献 1 1 JP, 9-49830, A (テル株式会社) 18. 2月. 1997 (18. 02. 97) (ファミリーなし)

文献 1 2 WO, 97/329, A (イエダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド) 3. 1月. 1997 (03. 01. 97) & EP, 871658, A & JP, 11-507920, A

文献 1 3 WO, 96/4402, A1 (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 15. 2月. 1996 (15. 02. 96) & US, 5582985, A & JP, 10-503655, A & EP, 7740 13, A

## 備考

## 請求の範囲 1、2

文献 1 ～ 1 0 には、請求の範囲 1 及び 2 に記載の化合物の実施例等が記載されているから、請求の範囲 1 及び 2 に記載の発明は、文献 1 ～ 1 0 に記載の事項であり、新規性を有さない。

## 請求の範囲 3、4

文献 3、4、5、7、8、1 0 には、上記化合物を重合成分又は共重合成分として高分子化合物を製造することが記載されているから、請求の範囲 3 及び 4 に記載の発明は、文献 3、4、5、7、8 又は 1 0 に記載の事項であり、新規性を有さない。

## 請求の範囲 5 - 1 2

文献 1 1 ～ 1 3 に記載されているような、ビオチンを用いる種々の周知の高分子化合物、材料において、それらの文献に記載のビオチンに代えて、文献 3、4、5、7、8、1 0 に記載のビオチン類似物を用いることは当業者に自明であるから、請求の範囲 5 ～ 1 2 に記載の発明は、文献 3、4、5、7、8 又は 1 0、及び、文献 1 1 ～ 1 3 に記載の事項から進歩性を有さない。

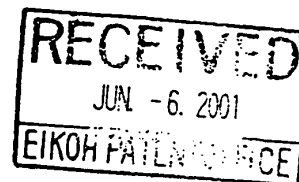
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

## 国際予備審査報告


(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]



出願人又は代理人 の書類記号 P-35490	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05113	国際出願日 (日.月.年) 28.07.00	優先日 (日.月.年) 29.07.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C07D495/04, C08F20/54, C08F20/38, C12N11/08		
出願人 (氏名又は名称) 経済産業省産業技術総合研究所長が代表する日本国		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>5</u> ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u>                    </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input checked="" type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 13.02.01	国際予備審査報告を作成した日 24.05.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  田村 聖子 	4C 9051  電話番号 03-3581-1101 内線 3452

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	5-12	有
	請求の範囲	1-4	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-12	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-12	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 Tarasow T. et. al., "Characteristics of an RNA Diels-Alderase Active Site.", J. Am. Chem. Soc., Vol.121, No.15(1999年4月 科学技術振興事業団受け入れ)P.3614-3617, Table 1 Substrate 9

文献2 NELSON P. et. al., "Convenient preparation of new C-5 biotinylated d UTP derivative.", Nucleosides Nucleotides, Vol.5, No.3(1986) P.233-241, SCHEME I Substrate 3

文献3 WO,86/1899,A1(Unilever PLC)27.3月.1986(27.03.86)whole document, especially P.11, Lines 2-4 & EP,178790,A1 & JP,62-500198,A

文献4 EP,226470,A2(Unilever PLC)24.6月.1987(24.06.87) & JP,62-156561,A

文献5 EP,914835,A2(Alomone Labs Ltd.)12.5月.1999(12.05.99)Whole Document P.5, Lines 47-52 (No Family)

文献6 JP,2-96581,A(株式会社 資生堂)9.4月.1990(09.04.90)表II

文献7 US,5863748,A(New Life Science Products, Inc.)26.1月.1999(26.01.99)(No Family)

文献8 WO,95/31730,A1(Microscreen Corp.)23.11月.1995(23.11.95)Whole Document, especially Example 6 & Example 8 & US,5750357,A

文献9 EP,11777,A1(Hoffmann-La Roche, F., und Co. A.-G.)11.6月.1980(11.06.80) & US,4245104,A

文献10 EP,922715,A2(Agency of Industrial Science and Technology MITI; Japan Chemical Innovation Institute)16.6月.1999(16.06.99) & JP,11-171928,A2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 99/64378, A1 [E, X]	16. 12月. 1999 (16. 12. 99)	10. 6月. 1999 (10. 06. 99)	10. 6月. 1998 (10. 06. 98)

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

文献 11 JP, 9-49830, A (テル株式会社) 18. 2月. 1997 (18. 02. 97) (ファミリーなし)

文献 12 WO, 97/329, A (イエダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド) 3. 1月. 1997 (03. 01. 97) & EP, 871658, A & JP, 11-507920, A

文献 13 WO, 96/4402, A1 (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 15. 2月. 1996 (15. 02. 96) & US, 5582985, A & JP, 10-503655, A & EP, 774013, A

## 備考

## 請求の範囲 1、2

文献 1～10 には、請求の範囲 1 及び 2 に記載の化合物の実施例等が記載されているから、請求の範囲 1 及び 2 に記載の発明は、文献 1～10 に記載の事項であり、新規性を有さない。

## 請求の範囲 3、4

文献 3、4、5、7、8、10 には、上記化合物を重合成分又は共重合成分として高分子化合物を製造することが記載されているから、請求の範囲 3 及び 4 に記載の発明は、文献 3、4、5、7、8 又は 10 に記載の事項であり、新規性を有さない。

## 請求の範囲 5～12

文献 11～13 に記載されているような、ビオチンを用いる種々の周知の高分子化合物、材料において、それらの文献に記載のビオチンに代えて、文献 3、4、5、7、8、10 に記載のビオチン類似物を用いることは当業者に自明であるから、請求の範囲 5～12 に記載の発明は、文献 3、4、5、7、8 又は 10、及び、文献 11～13 に記載の事項から進歩性を有さない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

P C T

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 P-35490	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/05113	国際出願日 (日.月.年) 28.07.00	優先日 (日.月.年) 29.07.99
出願人(氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第        図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C07D495/04, C08F20/54, C08F20/38, C12N11/08		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C07D495/04, C08F20/54, C08F20/38, C12N11/08		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Tarasow T. et. al., "Characteristics of an RNA Diels-Alderase Active Site.", J. Am. Chem. Soc., Vol.121, No.15(1999年4月 科学技術振興事業団受け入れ)P.3614-3617, Table 1 Substrate 9	1,2
X	NELSON P. et. al., "Convenient preparation of new C-5 biotin ylated dUTP derivative.", Nucleosides Nucleotides, Vol.5, N o.3(1986) P.233-241, SCHEME I Substrate 3	1,2
X Y	WO, 86/1899, A1 (Unilever PLC) 27.3月.1986 (27.03.86) whole docume nt, especially P.11, Lines 2-4 & EP, 178790, A1 & JP, 62-50019	1-4 5-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
13.10.00	17.10.00	
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4C 9051
日本国特許庁 (ISA/JP)	田村 聖子	
郵便番号100-8915		
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	8, A	
X Y	EP, 226470, A2 (Unilever PLC) 24. 6月. 1987 (24. 06. 87) & JP, 62-1565 61, A	1-4 5-12
X Y	EP, 914835, A2 (Alomone Labs Ltd.) 12. 5月. 1999 (12. 05. 99) Whole Do cument P. 5, Lines 47-52 (No Family)	1-4 5-12
X	JP, 2-96581, A (株式会社 資生堂) 9. 4月. 1990 (09. 04. 90) 表II	1, 2
X Y	US, 5863748, A (New Life Science Products, Inc.) 26. 1月. 1999 (26. 01. 99) (No Family)	1-4 5-12
X Y	WO, 95/31730, A1 (Microscreen Corp.) 23. 11月. 1995 (23. 11. 95) Whole Document, especially Example 6 & Example 8 & US, 5750357, A	1-4 5-12
X	EP, 11777, A1 (Hoffmann-La Roche, F., und Co. A.-G.) 11. 6月. 1980 (11. 06. 80) & US, 4245104, A	1, 2
X Y	EP, 922715, A2 (Agency of Industrial Science and Technology MIT I; Japan Chemical Innovation Institute) 16. 6月. 1999 (16. 06. 99) & JP, 11-171928, A2	1-4 5-12
Y	JP, 9-49830, A (テル株式会社) 18. 2月. 1997 (18. 02. 97) (ファミリーなし)	5-12
Y	WO, 97/329, A (イエダ リサーチ アンド デベロップメント カン パニー リミテッド) 3. 1月. 1997 (03. 01. 97) & EP, 871658, A & JP, 11-507920, A	5-12
Y	WO, 96/4402, A1 (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オ ブ カリフォルニア) 15. 2月. 1996 (15. 02. 96) & US, 5582985, A & J P, 10-503655, A & EP, 774013, A	5-12
PX	WO, 99/64378, A2 (Glycodesign Inc., Can.) 16. 12月. 1999 (16. 12. 99) & AU, 9944930, A	1, 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 P-35490	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J.P00/05113	国際出願日 (日.月.年) 28.07.00	優先日 (日.月.年) 29.07.99
出願人(氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C07D495/04, C08F20/54, C08F20/38, C12N11/08		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C07D495/04, C08F20/54, C08F20/38, C12N11/08		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Tarasow T. et. al., "Characteristics of an RNA Diels-Alder active site.", J. Am. Chem. Soc., Vol. 121, No. 15 (1999年4月 科学技術振興事業団受け入れ) P. 3614-3617, Table 1 Substrate 9	1, 2
X	NELSON P. et. al., "Convenient preparation of new C-5 biotinylated dUTP derivative.", Nucleosides Nucleotides, Vol. 5, No. 3 (1986) P. 233-241, SCHEME I Substrate 3	1, 2
X Y	WO, 86/1899, A1 (Unilever PLC) 27. 3月. 1986 (27. 03. 86) whole document, especially P. 11, Lines 2-4 & EP, 178790, A1 & JP, 62-50019	1-4 5-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
13. 10. 00	17. 10. 00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 聖子 印	4 C 9 0 5 1
	電話番号 03-3581-1101	内線 3452

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	8, A	
X	EP, 226470, A2 (Unilever PLC) 24. 6月. 1987 (24. 06. 87) & JP, 62-1565	1-4
Y	61, A	5-12
X	EP, 914835, A2 (Alomone Labs Ltd.) 12. 5月. 1999 (12. 05. 99) Whole Do	1-4
Y	cument P. 5, Lines 47-52 (No Family)	5-12
X	JP, 2-96581, A (株式会社 資生堂) 9. 4月. 1990 (09. 04. 90) 表II	1, 2
X	US, 5863748, A (New Life Science Products, Inc.) 26. 1月. 1999 (26.	1-4
Y	01. 99) (No Family)	5-12
X	WO, 95/31730, A1 (Microscreen Corp.) 23. 11月. 1995 (23. 11. 95) Whole	1-4
Y	Document, especially Example 6 & Example 8 & US, 5750357, A	5-12
X	EP, 11777, A1 (Hoffmann-La Roche, F., und Co. A.-G.) 11. 6月. 1980	1, 2
	(11. 06. 80) & US, 4245104, A	
X	EP, 922715, A2 (Agency of Industrial Science and Technology MIT	1-4
Y	I; Japan Chemical Innovation Institute) 16. 6月. 1999 (16. 06. 99)	5-12
	& JP, 11-171928, A2	
Y	JP, 9-49830, A (テル株式会社) 18. 2月. 1997 (18. 02. 97) (ファミリーなし)	5-12
Y	WO, 97/329, A (イエダ リサーチ アンド デベロップメント カン	5-12
	パニー リミテッド) 3. 1月. 1997 (03. 01. 97) & EP, 871658, A & JP,	
	11-507920, A	
Y	WO, 96/4402, A1 (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オ	5-12
	ブ カリフォルニア) 15. 2月. 1996 (15. 02. 96) & US, 5582985, A & J	
	P, 10-503655, A & EP, 774013, A	
PX	WO, 99/64378, A2 (Glycodesign Inc., Can.) 16. 12月. 1999 (16. 12. 99)	1, 2
	& AU, 9944930, A	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Version with Markings to  
Show Changes Made

a polymer by reacting its functional group so that even copolymerization with a monomer having a functional group reactive with a biotin immobilizing reagent makes it possible to synthesize the corresponding copolymer having biotin immobilized to the copolymer but containing the functional group remained unreacted.

Even in the case where the conventional biotin immobilization technique cannot be adopted because the functional group is enclosed in a high molecular chain, appropriate designing of a polymer makes it possible to integrate therein a biotin skeleton as a long polymer chain at any ratio.

For example, a thermo-responsive polymer having a biotin or iminobiotin site and exhibiting a lower ~~solution~~ critical <sup>solution</sup> temperature (LCST) or upper ~~solution~~ critical <sup>solution</sup> temperature (UCST) in an aqueous solution was found. It was found that a polymer obtained by copolymerizing the polymerizable biotin derivative of the invention with at least one monomer component selected from acrylamide and methacrylamide is a heat sensitive polymer compound having UCST (upper critical solution temperature) in an aqueous solution or physiological saline.

It was also found that by immobilizing biotin to a thermo-responsive polymer having LCST, the thermo-responsive polymer acquires markedly high aggregation force

Version 1.0  
Word Changes Made

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Table-2: Temperature of measurement solution exhibiting 50% of transmittance with varied charging ratio (molar ratio) of acrylamide and biotinol acrylate to obtain copolymer

When 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) is used as an initiator					When azoisobutyronitrile is used as an initiator				
	Charged ratio AAm:BA	Transmittance Temperature of 50% solution (°C)		Weight-average molecular weight		Charged ratio AAm:BA	Transmittance Temperature of 50% solution (°C)		Weight-average molecular weight
Ex. 11	30:1	2 (water)	2 (physiological saline)	140,000	Ex. 14	20:1	12 (water)	- 5 (physiological saline)	32,000
Ex. 12	20:1	18 (water)	15 (physiological saline)	89,000	Ex. 15	10:1	45 (water)	50 (physiological saline)	18,000
Ex. 13	15:1	37 (water)	28 (physiological saline)	98,000					

Molecular weight was measured using "G4000PW" of TOSO.

Physiological saline: Transmittance was measured in physiological saline.

Water: Transmittance was measured in distilled water.

Charged ratio: molar ratio

Polymerization temperature was 45 to 65°C in the presence of 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile).

Polymerization temperature was 80°C in the presence of azobisisobutyronitrile.

Concentration of the solution used for measuring transmittance in Example 11 or 12: 6 mg/ml

Concentration of the solution used for measuring transmittance in water in Example 13: 10 mg/ml

Concentration of the solution used for measuring transmittance in physiological saline in Example 13: 6 mg/ml

Concentration of the solution used for measuring transmittance in Example 14: 22.4 mg/ml

Concentration of the solution used for measuring transmittance in Example 15: 6 mg/ml

AAM: acrylamide BA: biotinol acrylate

The NMR data (in DMSO) of the acrylamide/biotinolate copolymer (charged molar ratio 20:1) are shown below.

Four peaks:  $\delta$  7.5-6.5, s:  $\delta$  6.4, s:  $\delta$  4.3, s:  $\delta$  4.1, s:  $\delta$  3.1, broad:  $\delta$  2.8, broad:  $\delta$  2.1, broad:  $\delta$  1.5-1.3.

The peaks were similar to the <sup>above</sup>~~below~~ ones in spite of a

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

change in the charged ratio (molar ratio). The homopolymer of bitinol acrylate exhibited peaks at similar sites to the copolymer except about one peak at  $\delta$  7.5 to 6.5.

The upper critical solution temperature (UCST) of the acrylamide/biotinol acrylate copolymer (charged molar ratio 20:1) is illustrated in FIGS. 1 to 3.

FIG. 1 illustrates a relationship between temperature and transmittance upon heating and upon cooling, wherein UCST (copolymer concentration: 10 mg/ml) of the acrylamide/biotinol acrylate copolymer (charged molar ratio 20:1) in water is indicated.

FIG. 2 illustrates variations of transmittance (upon cooling) of a copolymer which has recognized avidin in physiological saline, wherein variations in avidin recognition capacity of an acrylamide/biotinol acrylate copolymer (charged ratio: 20) in physiological saline (copolymer concentration: 6 mg/ml) and UCST are indicated (only transmittance upon cooling).

FIG. 3 illustrates variations of LCST (upon cooling) of an N-isopropyl acrylamide/biotinol acrylate copolymer by the addition of avidin. This diagram suggests that addition of avidin to an aqueous solution containing the copolymer decreases a change in its transmittance and heightens the solubility of the copolymer.

It has thus been found that a copolymer containing the

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

containing polymer compound, which comprises polymerizing a polymerizable biotin derivative of formula (I) according to Claim 1 or copolymerizing the derivative with another copolymer component.

4. A biotin-component-containing polymer compound, which comprises a polymerizable biotin derivative of formula (I) according to Claim 1 as a polymer component or a copolymer component.

5. A polymer compound which exhibits UCST (upper critical solution temperature) in an aqueous solution, the polymer compound comprising a polymerizable biotin derivative of formula (I) according to Claim 1 and acrylamide or methacrylamide as a copolymer component.

6. A polymer compound which exhibits LCST (lower critical solution temperature) in an aqueous solution, the polymer compound comprising a polymerizable biotin derivative of formula (I) according to Claim 1 and a high-molecular weight monomer component exhibiting LCST in an aqueous solution as copolymer component.

7. The polymer compound according to ~~any one of~~ Claims 4 ~~to 6~~, further comprising a hydrophilic or

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

hydrophobic monomer as another copolymer component.

8. The polymer compound according to ~~any one of~~  
<sup>Claim 4</sup>  
~~claims 4 to 7~~, wherein a biotinated antibody is immobilized  
through an avidin immobilized antibody or a binding site of  
the avidin.

9. A separating agent comprising a polymer compound  
of Claim 8.

10. An agent for testing microorganism through  
separation or concentration of the microorganism using a  
polymer compound of Claim 8.

11. An immobilized enzyme comprising a polymer  
compound of Claim 8.

<sup>The compound</sup>  
12. ~~A~~ polymer derivative of ~~any one of~~ Claims 4 ~~to~~ 7,  
wherein an avidin immobilized heat shock protein or a  
biotinated heat shock protein is immobilized through the  
binding site of avidin.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001年2月8日 (08.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/09141 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07D 495/04, C08F  
20/54, 20/38, C12N 11/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05113

(22) 国際出願日: 2000年7月28日 (28.07.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/215667 1999年7月29日 (29.07.1999) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 工業技術  
院長が代表する日本国 (JAPAN as represented by DI-  
RECTOR GENERAL OF AGENCY OF INDUSTRIAL  
SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-0013  
東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). 財  
団法人 化学技術戦略推進機構 (JAPAN CHEMICAL  
INNOVATION INSTITUTE) [JP/JP]; 〒111-0052 東京  
都台東区柳橋二丁目22番13号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

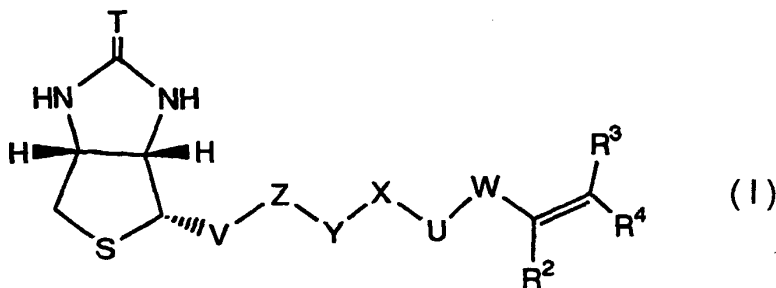
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 大西徳幸

(OHNISHI, Noriyuki) [JP/JP]. 吉田三喜子 (YOSHIDA,  
Mikiko) [JP/JP]; 〒305-0046 茨城県つくば市東一丁  
目1番地 工業技術院物質工学工業技術研究所内  
Ibaraki (JP). 片岡一則 (KATAOKA, Kazunori) [JP/JP];  
〒113-0033 東京都文京区本郷七丁目3番1号 東京大学  
大学院工学系研究科内 Tokyo (JP). 上野勝彦 (UENO,  
Katsuhiko) [JP/JP]; 〒305-0046 茨城県つくば市東一  
丁目1番地 工業技術院物質工学工業技術研究所内  
H-1棟2108号室 Ibaraki (JP).(74) 代理人: 小栗昌平, 外 (OGURI, Shohei et al.); 〒  
107-6028 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森  
ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).添付公開書類:  
— 国際調査報告書2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。(54) Title: POLYMERIZABLE BIOTIN DERIVATIVES, BIOTIN POLYMER, AND POLYMER RESPONSIVE TO AVIDIN  
STIMULATION

(54) 発明の名称: 重合性ビオチン誘導体、ビオチン高分子化合物及びアビジン刺激応答性高分子化合物

(57) Abstract: Novel polymerizable biotin derivatives which are represented by general formula (I). A polyfunctional polymer can be synthesized therefrom. In formula (I), R<sup>2</sup> represents hydrogen or alkyl; R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> each represents hydrogen, alkyl, or aryl; T represents oxygen or =NH; W represents a single bond, carbonyl, thiocarbonyl, or C<sub>1-5</sub> alkylene; U represents a single bond or -NH-; X represents a single bond, a C<sub>1-5</sub> hydrocarbon bond, oxygen, or -NH-; Y represents a single bond, carbonyl, thiocarbonyl, -NH-, 1,2-dioxyethylene, or 1,2-diaminoethylene; Z represents a single bond, carbonyl, thiocarbonyl, C<sub>1-5</sub> alkylene, oxygen, or -NH-; and V represents a single bond or C<sub>1-5</sub> alkylene.

[続葉有]

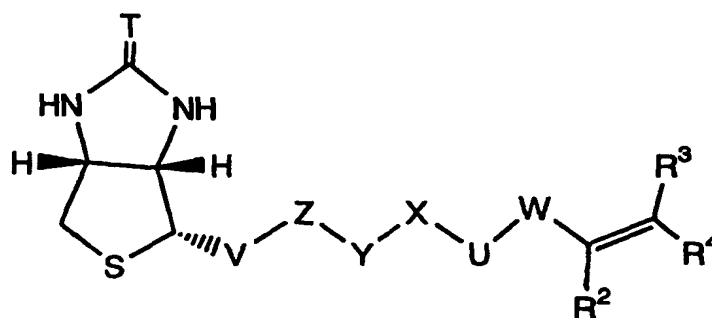
WO 01/09141 A1



(57) 要約:

下記一般式 (I) で表される新規重合性ビオチン誘導体を得、これを用いて多官能性、多重機能性の高分子を合成、設計可能とする。

一般式 (I)



式 (I) 中、R<sup>2</sup>は水素原子又はアルキル基、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>はそれぞれ水素原子、アルキル基又はアリール基、Tは酸素原子又は=NH基、Wは単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基もしくは炭素数1～5のアルキレン基、Uは単結合又は-NH-基、Xは単結合又は炭素数1～8の炭化水素結合、酸素原子もしくは-NH-基、Yは単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基、-NH基、1,2-ジオキシエチレン基もしくは1,2-ジアミノエチレン基、Zは単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基、炭素数1～5のアルキレン基、酸素原子もしくは-NH-基、Vは単結合又は炭素数1～5のアルキレン基を示す。

## 明 細 書

重合性ビオチン誘導体、ビオチン高分子化合物及びアビジン刺激応答性高分子化合物

## 技術分野

本発明は現在盛んに行われている（イミノ）ビオチン誘導体の固定化法として、優れた手法を提供する。さらにその誘導体を用いて（イミノ）ビオチン部位が固定化された機能性高分子の提供に関する。

## 背景技術

ビオチンとアビジンの高い結合性（例えば Methods Enzymol.184,5-13. 184,14-45 参照）を利用した技術が、イムノアッセイ（例えば特開平4-363659号公報、同6-160387号公報）、バイオセンサー（例えば特開平10-282040号公報、同9-292397号公報、同8-94510号公報）、DNA 操作（例えば特開平4-267896号公報）、分離材（例えば特開平5-340945号公報、同4-311397号公報）、臨床療法（例えば J. Nucl Med Commun 1991; 12: 211- 234. Int J. cancer 1990;45:1184-1189）などに適用されている。

上記各種方法を行うためには、蛋白（糖蛋白）、抗体、酵素、発色団、デキストラン等にビオチンを固定化することが必要であり、そのために種々のビオチン固定化試薬が発売されている(Methods Enzymol.184,123-138)。これは、生体系物質のアミノ基、硫黄基、カルボン酸、アルコール等の反応性の官能基にビオチン固定化試薬を反応させてビオチンを固定化するものである(例えば Molecular Probes Handbook of fluorescent Probes and Research Chemicals Chapter4 参照)。かかる固定化反応にはビオチンの誘導体が用いられる(例えば Molecular Probes Handbook of fluorescent Probes and Research Chemicals Chapter4 ,p87 参照)。また、この試薬を用いてポリエチレングリコール末端にビオチンを固定化した例も報告されている(Bioconjugate Chem.1997,8,545~551)。

以上に記載したビオチンの固定化は、元来ある物質、たとえば蛋白などの一つの官能基

について一つの反応を行いビオチンを固定化するという概念に基づくものである（例えば特開平6-148190号公報参照）。

上記の通り、ビオチンの有用性は種々の分野で実証されており、その工業的応用は新しい機能を発現する製品を導く可能性がある。しかしながら、上記ビオチン固定化試薬は高価であり、これらを用いたビオチン固定化法では、その工業的使用は難しい。また、水溶液中あるいは生理的食塩水中で降温操作により凝集する、上限臨界溶液温度（UCST）を有する感熱性高分子は分離剤、DDS等に応用が期待され(Macromol.Chem., Rapid Commun.13, 577-581(1992))、その高分子の出現が待望されている。

一方、上述したようにビオチン固定化試薬は反応性の官能基に固定化するため、官能基の保護が必要な場合があり、また立体障害が大きい官能基の場合や高分子鎖にビオチン骨格を固定化する場合などは、ビオチン固定化の反応自体が困難である。例えばマクロな高分子である蛋白などにビオチンを固定化する場合は、官能基が少なく十分な量のビオチンが固定できず、しかも蛋白表面に存在する官能基のみにしか固定化されない。高分子の重合度が高くなれば同様に従来の固定化法ではビオチンの固定化を思い通りに設計することは困難になる。

従って、本発明は、上記種々の分野に応用可能なビオチン成分を含有し、更に多官能性、多重機能性の高分子を合成、設計可能とすることを目的とする。

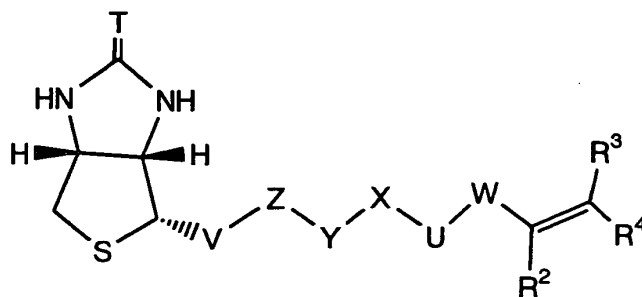
更に、本発明は、上記ビオチン成分含有高分子を工業的に製造でき、優れた経済性及び効率性で合成、設計することを目的とする。

また、本発明は、水溶液中で降温操作により凝集し、更に生理的食塩水中でも上限臨界溶液温度（UCST）を有する感熱性高分子、および水溶液中で昇温操作により凝集し、水溶液中で下限臨界温度（LCST）を有する感熱性高分子を提供することを目的とする。

#### 発明の開示

本発明の上記目的は、下記一般式（I）で示される重合性ビオチン誘導体を用いることにより達成されることが見いだされた。

## 一般式 (I)



式 (I) 中、 $R^2$  は水素原子又はアルキル基を示す。 $R^3$  及び  $R^4$  はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基又はアリール基を示す。

T は酸素原子又は  $=NH$  基を表す。

W は単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基もしくは炭素数 1～5 のアルキレン基を示す。U は単結合又は  $-NH-$  基を示す。X は単結合又は炭素数 1～8 の炭化水素結合、酸素原子もしくは  $-NH-$  基を示す。Y は単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基、 $-NH-$  基、1, 2-ジオキシエチレン基もしくは 1, 2-ジアミノエチレン基を示す。Z は単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基、炭素数 1～5 のアルキレン基、酸素原子もしくは  $-NH-$  基を示す。V は単結合又は炭素数 1～5 のアルキレン基を示す。

即ち、本発明においては、生体機能を有する上記重合性ビオチン誘導体（以下、単にビオチンモノマーとも称する）を重合することにより、容易かつ工業的、経済的に（イミノ）ビオチンを固定化した高分子の合成が可能になる（なお、以下本明細書において用いる「ビオチン」は、具体的に化合物名として挙げられた場合を除き、イミノビオチンをも含めた意味で用いる）。

出発物質のビオチンを固定化したビオチンモノマーは工業的にも成り立つ経済性と効率性がある。

また公知のビオチン固定化技術の如き、高分子中の官能基に反応させてビオチンを固定化するものではないため、例えば、ビオチン固定化試薬に反応する官能基を有するモノマ

一と共重合させてもその官能基を未反応のまま含有する、ビオチンを固定化した形式の共重合体を合成することができる。

更に高分子鎖が官能基を包み込み、ビオチン固定化を従来の技術により行えない場合などであっても、高分子の設計を適宜行うことにより、任意の割合で長鎖の高分子側鎖としてビオチン骨格を組み込むという高分子設計が可能となる。

例えば、ビオチンまたはイミノビオチン部位を有する、水溶液中で下限溶液臨界温度 (LCST)又は上限溶液臨界温度 (UCST) を有する熱応答性高分子を見出すに至った。本発明の重合性ビオチン誘導体を、アクリルアミド及びメタクリルアミドから選択される少なくとも1種のモノマー成分と共重合させて得た高分子は、水溶液中及び生理的食塩水中でUCST (上限臨界溶液温度) を有する感熱性高分子化合物であることがわかった。

更に、LCST を有する熱応答性高分子にビオチンを固定化することにより、LCST 以上で非常に凝集力の強い熱応答性高分子となることを見出した。

これらの高分子はビオチンを固定化していることから、種々のアビジン固定化リガンド、或いはアビジンの4カ所の結合部位を介して、種々のビオチン化リガンドを簡便に固定化することができる。なお、本明細書における「アビジン」は、ストレプトアビジンを含む意味で用いる。

さらに、本発明の熱応答性高分子誘導体は、水溶液中、生理的食塩水中、緩衝溶液中でLCST 以上又は UCST 以下で凝集力の大きな熱応答性有するため、各種物質の分離、固定化酵素、検量、制御等に有効に適用する事ができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、昇温時と降温時の温度と透過率の関係であり、アクリルアミド/ビオチノールアクリレート共重合体 (仕込み比20) の水中におけるUCST (コポリマー濃度10mg/ml)を示す。

図2は、生理的食塩水中におけるアビジンを認識したコポリマーの透過率変化 (降温時) であり、アクリルアミド/ビオチノールアクリレート共重合体 (仕込み比20) の生理的食塩水中 (コポリマー濃度6mg/ml) におけるアビジン認識能とUCSTの変化 (降

温時の透過率のみ)を示す。

図3は、N-イソプロピルアクリルアミドとビオチノールアクリレートコポリマーのアビジン添加によるLCST変化(降温時)を示す。

発明を実施するための最良の形態

更に本発明について詳細に説明する。

上記式(I)で示される重合性ビオチン誘導体において、好ましくは $R^2$ は水素原子又は炭素数1～3のアルキル基を示し、 $R^3$ 及び $R^4$ はそれぞれ水素原子、炭素数1～3のアルキル基又はフェニル基を示す。特に好ましくは、 $R^2$ は水素原子又はメチル基を示し、 $R^3$ 及び $R^4$ はそれぞれ水素原子、メチル基又はフェニル基を示す。アルキル基及びアリール基は、必要に応じて更に置換基を有していてもよい。

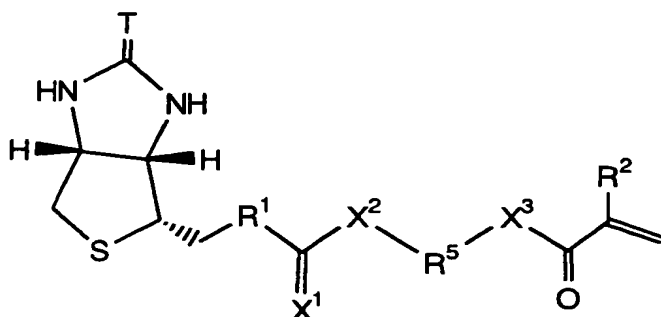
式(I)において、 $-V-Z-Y-X-U-W-$ で表される結合基としては、具体的には、下記表-1に記載のものが挙げられる。

表-1

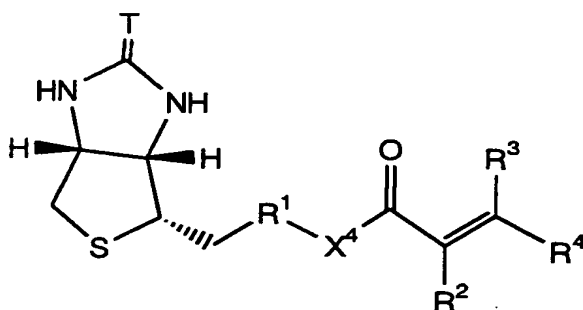
例	V	Z	Y	X	U	W
(1)	炭素数1～5のアルキル基	酸素原子又は -NH-基	カルボニル基 又はチオカル ボニル基	単結合	単結合	単結合
(2)	炭素数1～5のアルキル基	酸素原子又は -NH-基	カルボニル基 又はチオカル ボニル基	酸素原子又は -NH-基	単結合	カルボニル基 又はチオカル ボニル基
(3)	炭素数1～5のアルキル基	単結合	カルボニル基 又はチオカル ボニル基	1,2-ジオキシエチ レン基又は1,2-ジ アミノエチレン基	単結合	カルボニル基 又はチオカル ボニル基
(4)	炭素数1～5のアルキル基	単結合	単結合	単結合	単結合	単結合
(5)	炭素数1～5のアルキル基	単結合	単結合	酸素原子又は -NH-基	単結合	単結合
(6)	炭素数1～5のアルキル基	カルボニル基	-NH-基	炭素数1～8の 炭化水素結合	-NH- 基	カルボニル基

更に好ましくは、式 (I) で示される重合性ビオチン誘導体として、下記式 (1 a) ~ (I c) で表される重合性ビオチン誘導体が挙げられる。

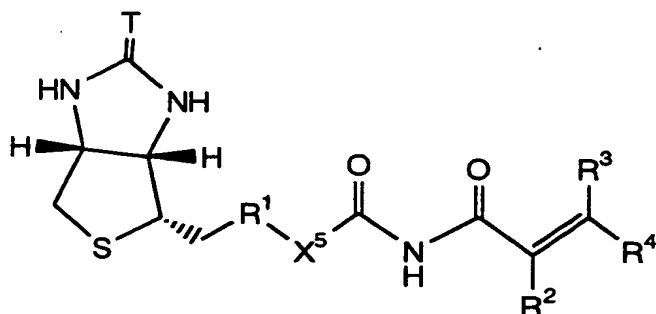
一般式 (I a)



一般式 (I b)



一般式 (I c)



一般式 (I a) ~ (I c) 中、R¹は単結合又は炭素数 1 ~ 4 のアルキレン基を示し、R⁵は炭素数 2 又は 3 のアルキレン基を示す。

X¹は酸素原子又は硫黄原子を示し、X²~X⁵はそれぞれ独立に、酸素原子又は-NH-基を示す。

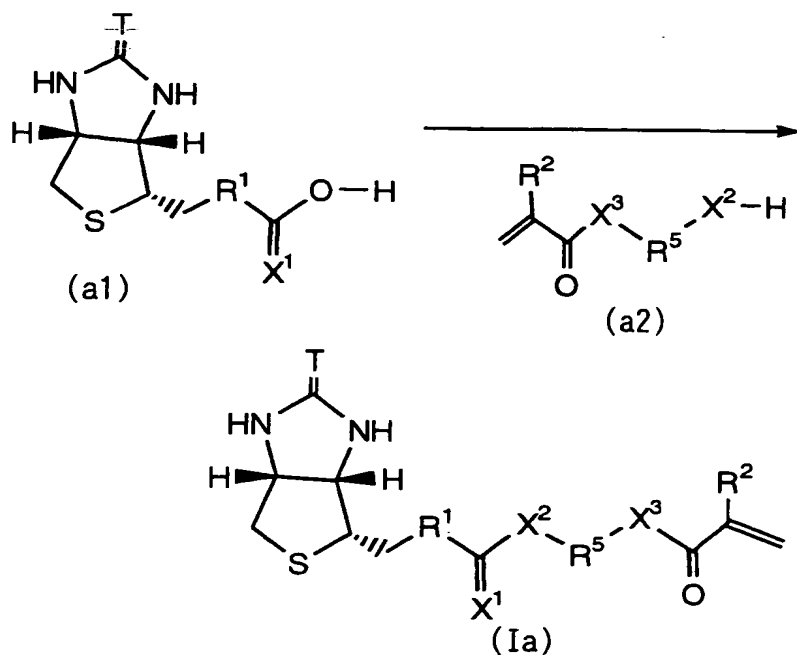
T、R²、R³及びR⁴はそれぞれ上記式 (I) で定義される通りある。

式 (I a) において、好ましくは、 $R^1$  は炭素数 1 ～ 5 のアルキレン基、より好ましくは炭素数 2 ～ 4 のアルキレン基を示し、 $R^5$  は炭素数 2 又は 3 のアルキレン基を示し、 $R^2$  は好ましくは水素原子又はメチル基を示し、 $X^1$  は酸素原子又は硫黄原子を示し、 $X^2$  及び  $X^3$  はそれぞれ独立して酸素原子又は  $-NH-$  基を示す。T は酸素原子又は  $=NH$  基を示す。

式 (I b) において、好ましくは、 $R^1$  は炭素数 1 ～ 5 のアルキレン基、より好ましくは炭素数 2 ～ 4 のアルキレン基を示し、 $R^2$  は好ましくは水素原子又はメチル基を示し、 $R^3$  及び  $R^4$  はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基又はアリール基を示し、より好ましくは水素原子を示す。 $X^4$  は好ましくは酸素原子又は  $-NH-$  基を示す。T は酸素原子又は  $=NH$  基を示す。

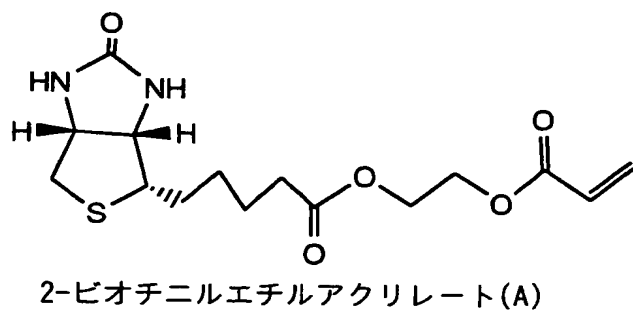
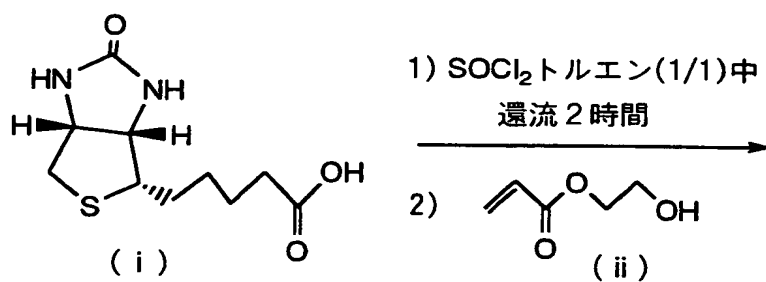
式 (I c) において、好ましくは、 $R^1$  は炭素数 1 ～ 5 のアルキレン基、より好ましくは炭素数 2 ～ 4 のアルキレン基を示し、 $R^2$  は好ましくは水素原子又はメチル基を示し、 $R^3$  及び  $R^4$  はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基又はアリール基を示し、より好ましくは水素原子を示す。 $X^5$  は好ましくは酸素原子又は  $-NH-$  基を示す。T は酸素原子又は  $=NH$  基を示す。

上記一般式 (I a) で示される重合性ビオチン誘導体は、一般に下記一般式 (a 1) で示されるビオチン又はビオチン誘導体の側鎖カルボキシル水酸基を適当な脱離基に変換後、下記一般式 (a 2) で示されるアクリル誘導体と縮合反応させることにより得ることができる。

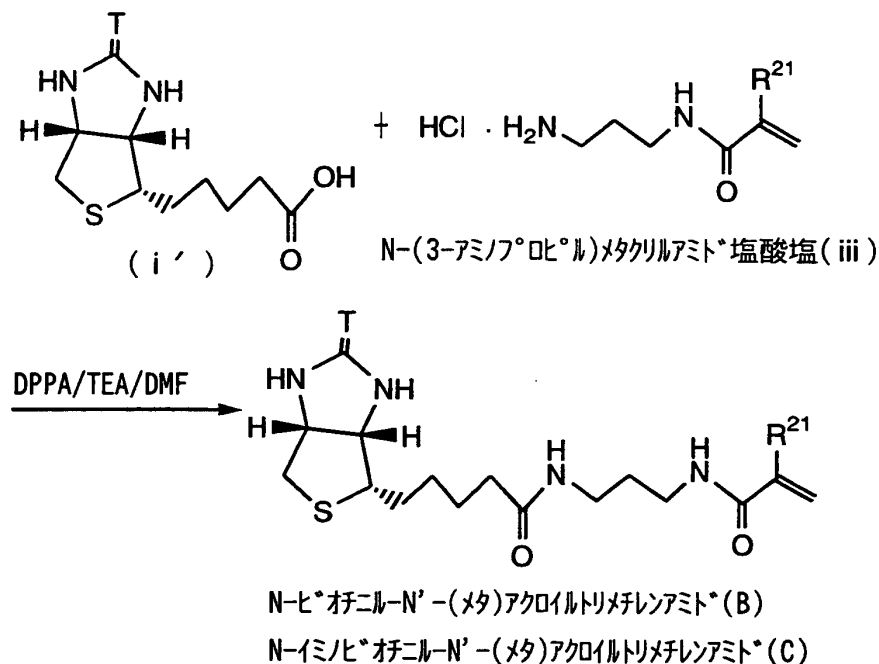


その具体的方法を以下に示す。

例えば、下記に示す通り、下記のビオチン (i) のカルボキシル基を塩化チオニル／トルエン中で2時間還流した後、2-ヒドロキシエチルアクリレート (ii) と縮合反応することにより2-ビオチニルエチルアクリレート (A) を得ることができる。

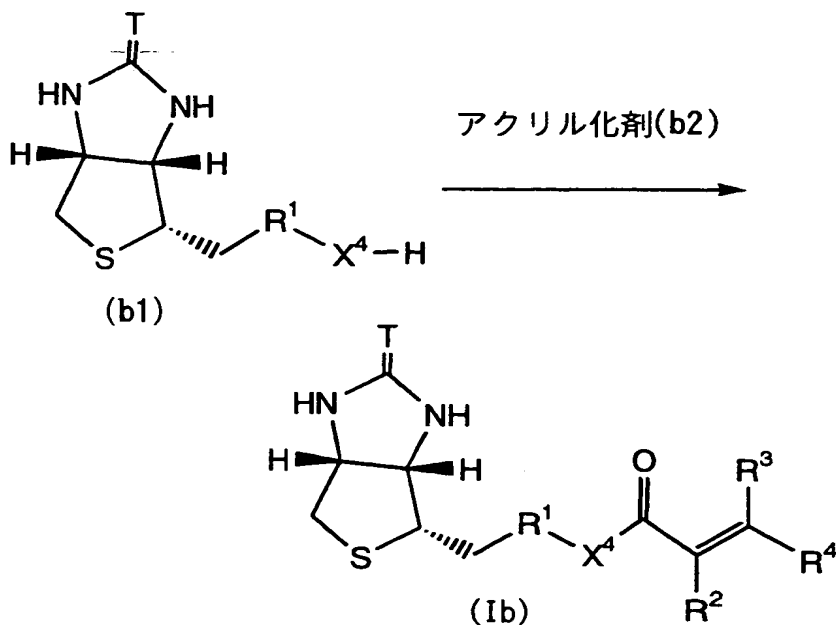


また、下記に示す通り、(イミノ) ビオチン (i') と N-(3-アミノプロピル) メタクリルアミド塩酸塩 (iii) を、ジフェニルホスフォニルアジド (DPPA)、トリエチルアミン (TEA) 及び N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) の存在下反応させることにより、N-ビオチニル-N'-(メタ) アクロイルトリメチレンアミド (B) 又は N-イミノビオチニル-N'-(メタ) アクロイルトリメチレンアミド (C) を得ることができる。



(ここで、R<sup>21</sup>は水素原子又はメチル基を示す。)

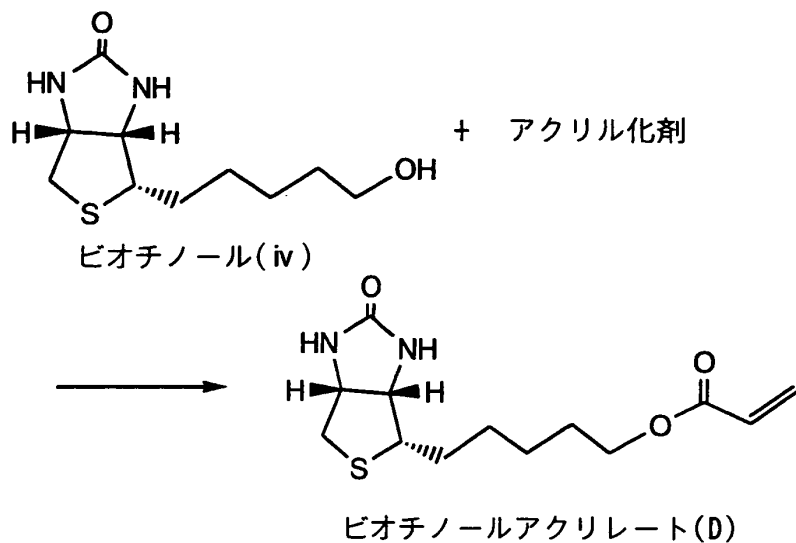
上記一般式 (I b) で示される重合性ビオチン誘導体は、一般に下記一般式 (b 1) で示されるビオチン誘導体を、適当なアクリル化剤 (b 2) (メタクリル化剤等も含む。例えばアクリル酸、アクリル酸クロリド、無水アクリル酸、アクリロキシスクシンイミド等のアクリル化剤、メタクリル酸、メタクリル酸クロリド、無水メタクリル酸、メタクリロキシスクシンイミド等のメタクリル化剤等) と反応させて得ることができる。



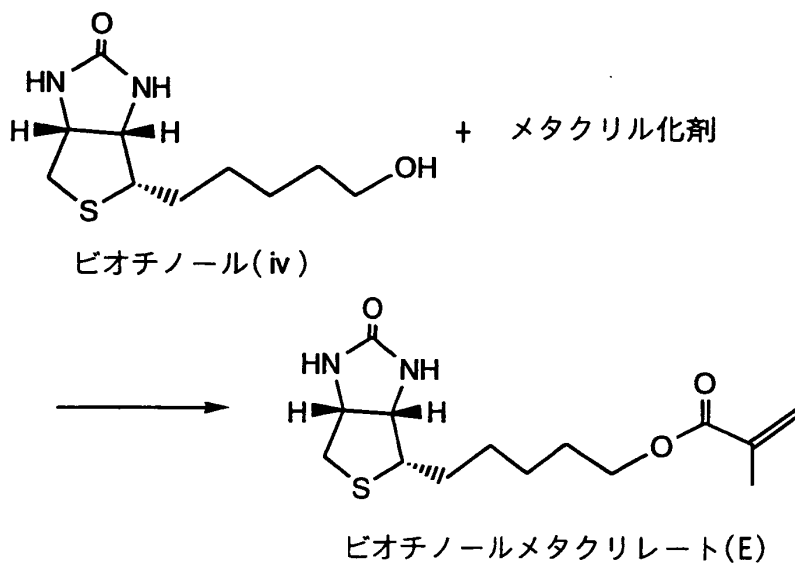
ここで、式 (b 1) のビオチン誘導体は、式 (a 1) のビオチン又はビオチン誘導体を適当な還元剤で還元することによりアルコール体 ( $X^4$  = 酸素原子) を得ることができ、更に該アルコール体の水酸基を脱離基機能を有する官能基に変換後、アミン誘導体 ( $X^4$  =  $-NH-$ ) と置換反応させることにより得ることができる。

その具体的製造方法を以下に示す。

例えば、下記に示す通り、市販のビオチン (Merck 製) を、例えばソジウムボロハイドライド、ジイソブチルアルミニウムハイドライド、THFボラン、リチウムアルミニウムハイドライド (Flaster and Kohn, J. Heterocycl. Chem. (1981), 18(7), 1425-36) 等の還元剤にて還元してビオチノール (iv) を得、ビオチノール (iv) をアクリル化剤と反応し、再結晶にてビオチノールアクリレート (D) を得ることができる。

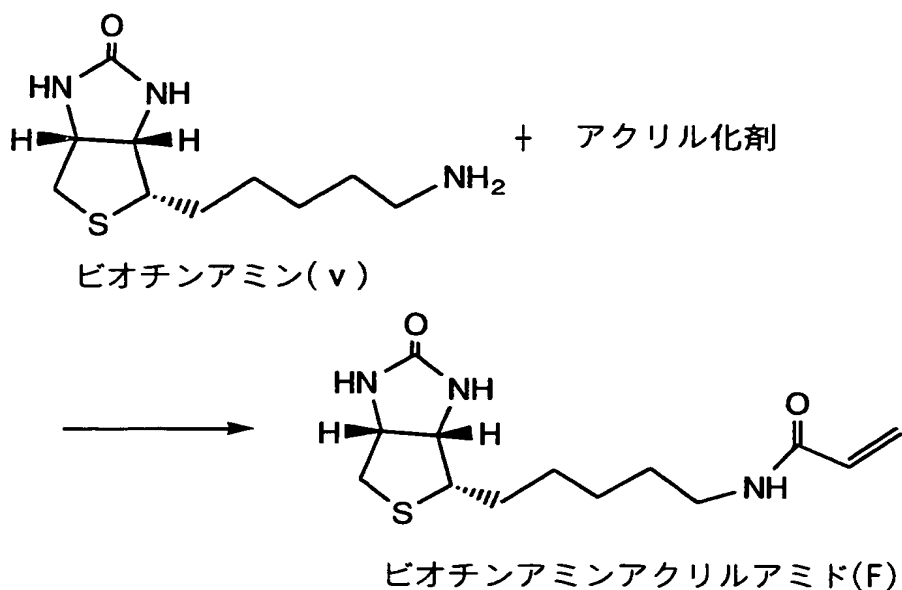


また、上記ビオチノール (iv) を、メタクリル剤と反応させて、ビオチノールメタクリレート (E) を得ることができる。

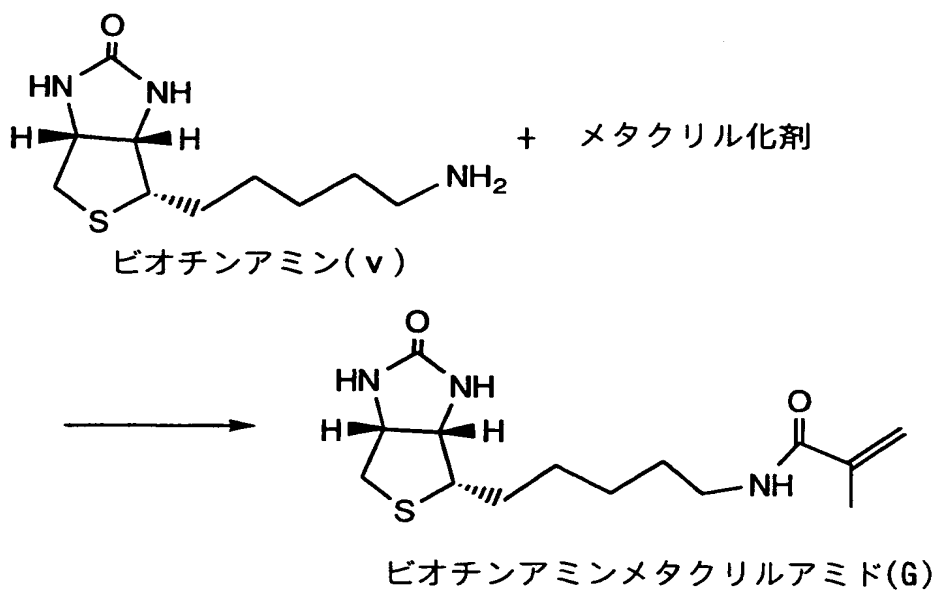


また、下記に示す通り、ビオチノール (iv) の水酸基を脱離機能を有する官能基に変換後、アミン誘導体と置換反応した後ビオチンアミン (v) を得、ビオチンアミンもしくはその塩等を縮合剤 (ジエチルリン酸シアニド、ジフェニルリン酸アジド等) の共存下、アクリル化剤と反応することにより、ビオチンアミンアクリルアミド (F) を得ることがで

きる。

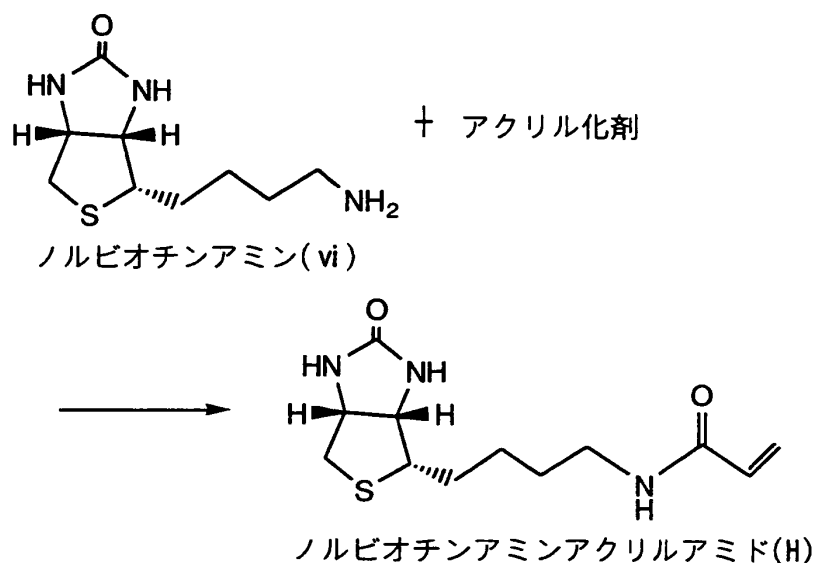


同様に、ビオチンアミン(v)もしくはその塩を縮合剤(ジエチルリン酸シアニド、ジフェニルリン酸アジド等)の共存下メタクリル化剤と反応することによりビオチンアミンメタクリルアミド(G)を得ることができる。

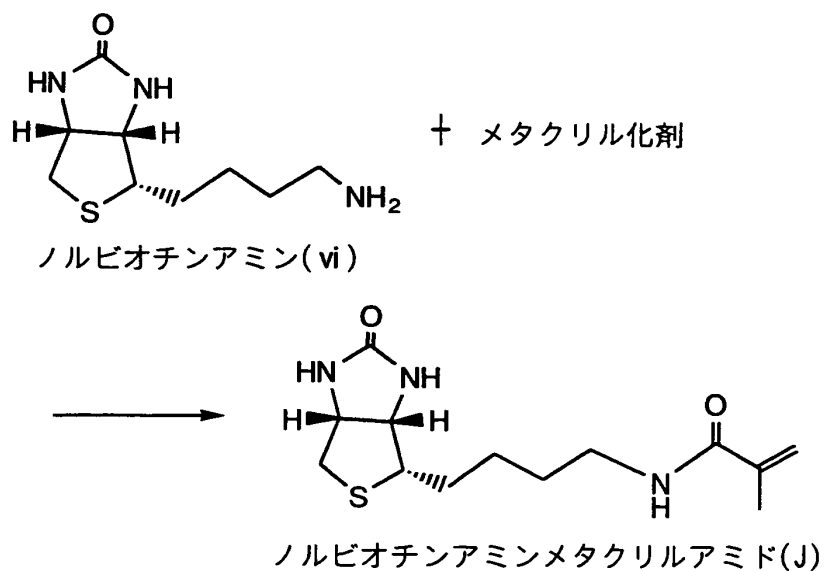


更に、下記に示す通り、ノルビオチンアミン(vi)もしくはその塩を縮合剤(ジエチル

リン酸シアニド、ジフェニルリン酸アジド等)の共存下にてアクリル化剤と反応することにより、ノルビオチンアミンアクリルアミド(H)が得られる。

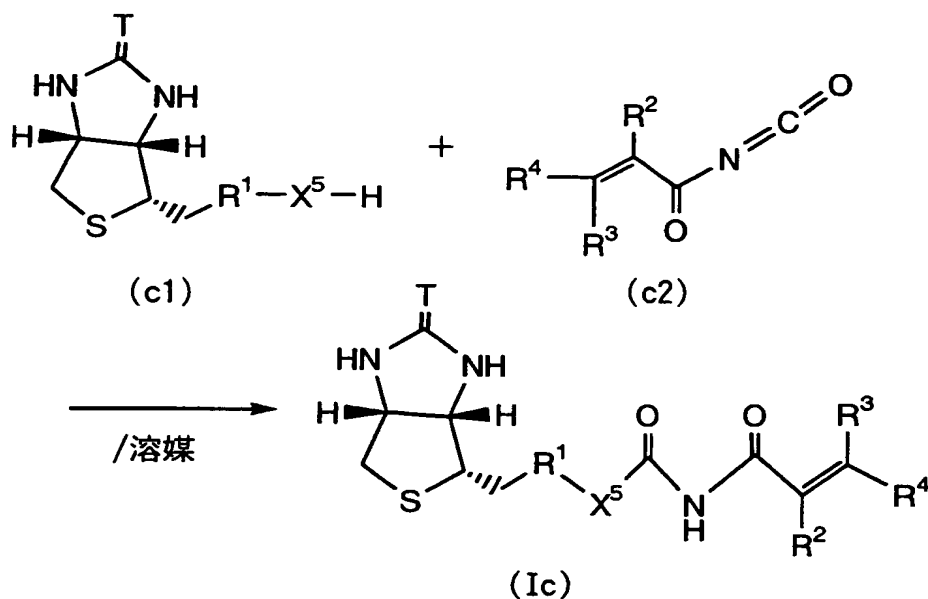


同様に、ノルビオチンアミン(vi)またはその塩を縮合剤(ジエチルリン酸シアニド、ジフェニルリン酸アジド等)の存在下メタクリル酸と反応することにより、ノルビオチンアミンメタクリルアミド(J)を得る。

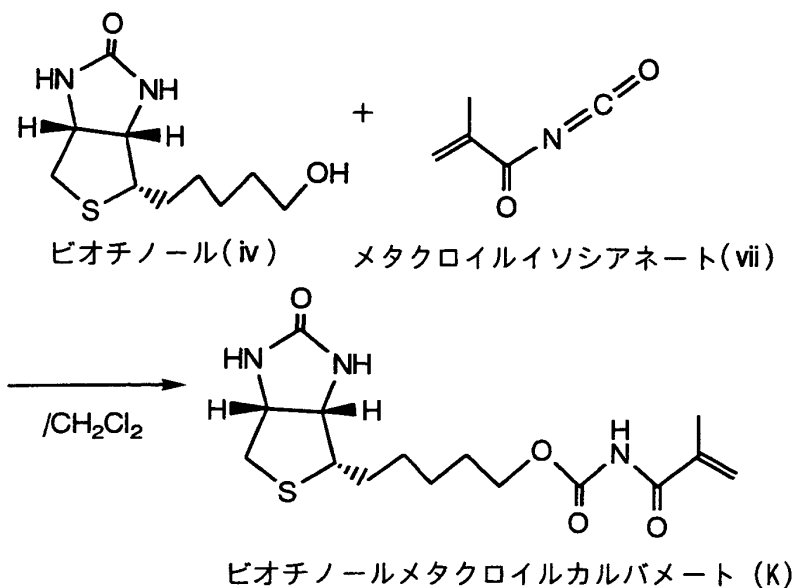


上記一般式(I c)で示される重合性ビオチン誘導体は、一般に下記一般式(c 1)で

示されるビオチン誘導体を、THF、DMSO、エーテル、DMF、時クロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、アセトン、脂肪族炭化水素、ベンゼン、トルエン等の非プロトン性溶媒中で、式(c2)で示されるイソシアネート化合物と反応させることにより得ることができる。

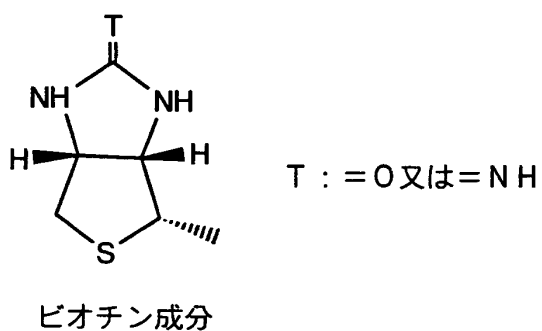


具体的には、例えば、ビオチノール (iv) を塩化メチレン等の溶媒中でメタクロイルイソシアネート (vii) と反応させることにより、ビオチノールメタクロイルカルバメート (K) を得ることができる。



上記のようにして得られた本発明の新規重合性ビオチン誘導体（ビオチンモノマー）は、ビオチンモノマーそのもの、あるいは該ビオチンモノマーと共重合性を有するモノマーとともに、通常の方法に従い、例えば可溶性溶媒中に適当なラジカル開始剤を用いて重合することにより、ビオチン成分を含有する高分子誘導体（以下単にビオチン高分子と称することもある）を得ることができる。これにより、有用性の高いビオチンが固定化された高分子化合物を容易にかつ工業的に得ることができる。ここで、「ビオチン成分」とは、アビジン（ストレプトアビジンを含む）と高い結合性を有する部分をいい、具体的には、下記式（II）で示される成分（ビオチン成分及びイミノビオチン成分を含む）を言う。

一般式（II）



本発明では、他の任意のモノマー成分と共重合させることにより、各モノマーの機能をそなえたビオチン高分子の合成、設計が可能である。その結果、多官能性、多重機能性高分子の合成が可能になる。高分子そのものの特性をいかしつつ、さらにこのビオチンモノマーを重合することによりビオチンモノマーの有用性を利用できる相乗効果のあるビオチンポリマーの製造が可能になる。

上記重合性ビオチン誘導体と共重合させることのできる共重合成分としては、重合性のあるものであれば特に限定されず、ビニル系、ビニリデン系、ブタジエン系等の種々の重合性モノマーを挙げることができる。更に具体的には、アクリルアミド、メタクリルアミド、スチレン、N-アルキルアクリルアミド、アクリル酸メチルエステル、酢酸ビニル、メタクリロニトリルメチルメタクリレート、イソブレンなどを挙げることができる。共重合比は特に限定的ではなく、必要に応じて任意の割合で共重合させることができる。

反応後得られた高分子誘導体は、通常の方法に従い精製することが好ましい。例えばアルコール系溶媒に注ぎ沈殿させることにより精製することができる。

本発明のビオチン高分子の具体的設計例、応用例を以下に述べる。

例えば、本発明に従うポリマーを架橋材を用いてゲル化すると、ゲル内部にまでビオチンを固定化したゲルの容易な設計・合成が可能となる。また磁性体にコーティングしたり、分離材料として用いたりすることも容易になる。

また、ビオチンモノマーの特異性を考慮し、他のモノマーとの共重合による分子設計で新たな特異性が出現するポリマーを得ることもできる。

例えば、PNIPAM（ポリ-N-アルキルアクリルアミド）はLCST（下限臨界溶液温度）を示す公知の高分子であるが(J.Macromol.Sci.Chem.,A<sub>2</sub>,1441(1968))、例えばN-イソプロピルアクリルアミドとビオチンモノマーを共重合したものは、LCST特性を失うことなく、分子認識能も有することができる。

LCST（下限臨界溶液温度）を有するポリマーは、相転移温度より高温側にて凝集し、低温側にて溶解する性質を示し、各種分離剤、薬物放出制御、人工筋肉、センサー、アクチュエーター、細胞培養用担体等に広く利用される。

本発明で用いることのできる水溶液中で LCST を示す高分子のモノマー成分としては特に限定はされないが、具体的には、ポリ-N-メチル（メタ）アクリルアミド、ポリ-N-エチル（メタ）アクリルアミド、ポリ-N-プロピル（メタ）アクリルアミド、ポリ-N-イソプロピル（メタ）アクリルアミド、ポリ-N-ブチル（メタ）アクリルアミド、ポリ-N-アクリロイルピロリドン、ポリ-N-アクリロイルモルホリン、ポリ-N,N-ジメチル（メタ）アクリルアミド、ポリ-N,N-ジエチル（メタ）アクリルアミド等のポリ-（メタ）アクリルアミド誘導体、N-ビニルアセトアミド、N-ビニルブチルアミド、N-ビニルイソブチルアミド等のポリ-N-ビニルアミド誘導体、ポリビニルアセテート部分的加水分解物誘導体、メチルセルロース誘導体、ポリ-メチルビニルエーテル、ポリ-エチルビニルエーテル等のアルキルビニルエーテル誘導体などが挙げられる。

一方、アクリルアミド又はメタクリルアミドと本発明のビオチンモノマーとを共重合させて得た高分子はUCST（上限臨界溶液温度）特性を水溶液中および生理食塩水中で示すことが見出された。

UCSTを有する高分子誘導体（以下単にUCSTポリマーと称することもある）は、上記アクリルアミド又はメタクリルアミドと本発明のビオチンモノマーとの仕込み比（モル比）は、前者対後者の仕込み比が3～30の間であることが好ましい。UCSTの測定方法としては、得られたポリマーを水又は食塩水中に溶解し、石英セルに入れ、その光路に550nmの光源をあて、その透過率と温度の関係について調べる方法を採用することができる。

このUCSTポリマーは、温度刺激応答性ポリマーとしてその応用範囲には、上記と同様の分野において考えられるが、LCSTポリマーとは逆に、高温側にて溶解し、低温側にて凝集するものであるため、LCSTポリマーとは異なる材料開発の可能性がある、刺激応答材料として魅力の有る製品として期待される。

特に、低温にて凝集するUCSTポリマーを含有する被覆膜上での細胞培養用担体においては、UCSTポリマーを被覆した担体上に培養された培養細胞とたん体を低温にて分離することができる（組織培養、17,9,349-353(1990)）。また、高温側の溶液中に共存する薬物と結合したポリマーが、温度変化を受け、低温環境に対応した凝集ポリマーに変化する

ることにより、その薬物をポリマー内部に包含することになる。つまり、薬物放出制御が行われる(Macromolecules 1994,27,947-952)。

本発明では、上記高分子化合物に、更に親水性又は疎水性のモノマーを共重合成分として含有させることができる。これにより、水溶液中でのLCSTやUCSTを変化させることができる。ここで、親水性、疎水性とは、高分子の主成分となるモノマーに対する親水性または疎水性であることを意味する。

具体的には、上記の通り主成分となるモノマーとの関係であるため一概に言えないが、親水性モノマーとしてはアクリル酸、メタクリル酸、アクリルアミド、メタクリルアミド等を、疎水性モノマーとしては、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル、塩化ビニル、塩化ビニリデン、スチレンなどを挙げる事が出来る。

本発明の高分子化合物の分子量は特に限定されず、高分子化合物のUCSTやLCSTなどの性質はその分子量にあまり依存しない。現実的には通常重量平均分子量500～1000000程度、さらに好ましくは1000～100000程度である。

分離剤を目的とする場合、好ましいUCST又はLCSTは0～50℃、特に好ましくは0～40℃である。

本発明において、LCST又はUCSTの範囲（スイッチング範囲）は狭ければ狭いほど良く、本発明によれば、実用的な5℃以下のスイッチング範囲のLCST又はUCSTを有する熱応答性高分子が得られる。

本発明のビオチンモノマーは生体機能を有する高分子材料として有用なモノマーであり、その用途は多岐にわたる（例えば、Chemical Sensors Vol.12 No.1(1996)p.8～11参照）。それはビオチンそのものがアビジンを分子認識するだけでなく、その他コラーゲンなどの蛋白とも結合するというように複数の物質を認識することができる生体機能材料といえることができるからである。またアビジンを介したサンドイッチ構造を利用してアフィニティクロマトグラフィーや、多くの抗体を認識することを利用した免疫化学などの広範な分野に、その応用が考えられる。

本発明の熱応答性高分子は（イミノ）ビオチンを固定化しているため、共有結合の生成によりリガンドを固定化する必要はなく、アビジン-ビオチンのアフィニティーの利用に

よりリガンドを固定化する事が可能である。

或いはアビジンはビオチンを認識する部位が4カ所あるため、アビジンの結合部位の一つをビオチン固定化熱応答性高分子に使用し、残りのビオチン結合部位を用いて、任意のビオチン化抗体、ビオチン化酵素、ビオチン化ヒートショックプロテイン等を固定化できる。

また予めアビジン固定化リガンドを調整すれば、直接ビオチン固定化熱応答性高分子にリガンドの固定化が可能である。

固定化したリガンドに、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体を用いれば、水溶液中の微生物の分離、濃縮が非常に容易にできる。即ち本発明の熱応答性高分子にアビジン化あるいはビオチン化された特定の微生物に対するモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体を結合させ、溶液中の微生物と十分に接触させ、溶液の温度を昇温し微生物とともに熱応答性高分子を凝集させ、容易にデカンテーションにより微生物を回収することができる。例えば、これにビオチン化サルモネラ抗体を結合させることにより、食品けん濁液中のサルモネラ菌だけを簡単に濃縮、分離することが出来る。適当な抗体および検出試薬と組み合わせることで、従来より格段に感度のより微生物検査キットや診断薬に適用することが出来る。

更に本発明の熱応答性高分子に任意の核酸のビオチン化された対塩基を結合させることにより、特定の遺伝子の精製、濃縮、検出等に用いることができる。

本発明の刺激応答性材料に結合ないし吸着した標的物質は、例えば、①塩濃度を上げる、②pHを変える（酸性又はアルカリ性にする）、③阻害剤、基質等を加える、④尿素、SDSなどの変性剤を加える、⑤有機溶媒、金属イオンなどを加える、⑥温度を変える、などの方法により容易に溶出することができる。

本発明の熱応答型分離材料は、更に具体的には、細菌、残留農薬の検出等の如き検査薬、診断薬への応用、微生物や細胞培養の生体物等のバイオプロダクトの分離、酵素や分子シャペロン等の固定化による生体反応機能の活性化・維持などに特に有効に利用できる。

更に、本発明のビオチンを固定化したビオチンモノマーは工業的にも成り立つ経済性と効率性がある。

## 実施例

以下実施例において、本発明を更に具体的に詳述するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

## 実施例 1 [2-ビオチニルエチルアクリレート (化合物 A) の合成]

ビオチン (化合物 i、Merck 製) 500mg、2-ヒドロキシエチルアクリレート 200mg、塩化チオニル 20ml 及びトルエン 20ml を室温にて混合し、還流を 2 時間行った。溶媒を減圧下除去し、クロロホルム-メタノール混合溶媒にてカラムクロマトを行い、溶媒を除去して、2-ビオチニルエチルアクリレート (化合物 A) 100mg を粉末物質として得た (収率 14 %)。

NMR 分析で目的化合物 A を良く指示した (inDMSO)。

NH およびアクリル基結合 H : 5H,  $\delta$  5.8 ~ 6, 6 $\alpha$ , 3 $\alpha$ , OCH<sub>2</sub> : 6H, multi,  $\delta$  4.1~4.3、6  $\alpha$  : 1H, multi,  $\delta$  3.1、6  $\beta$  : 1H, d,  $\delta$  2.8、CH<sub>2</sub> : 8H,  $\delta$  1~1.6。

## 実施例 2 [N-ビオチニル-N'-メタクロイルトリメチレンアミド (化合物 B) の合成]

N-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩 (化合物 iii) 18 g とビオチン 24 g とトリエチルアミン 30 g を 300 ml の N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解し、0℃に冷却した。この混合物中にジフェニルホスフォニルアジド 28 g を 50 ml の DMF に溶解させた溶液を 1 時間かけて滴下した。滴下終了後、0℃で 3 時間攪拌し、更に室温で 12 時間攪拌を行った。反応終了後減圧下、溶媒を留去し、残留物をクロロホルム-メタノール混合溶媒を展開溶媒に用いてカラムクロマトグラフィーを行ったところ、目的物である N-ビオチニル-N'-メタクロイルトリメチレンアミド (化合物 B) 22 g を白色粉末として得た (収率 59 %)。

NMR 分析で目的化合物 B を良く指示した (inDMSO)。

CONH : 2H, br.s,  $\delta$  7.9、NH, NH : 2H, d,  $\delta$  6.4、H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> : 2H, s,  $\delta$  5.6,  $\delta$  5.3、3 $\alpha$ , 6 $\alpha$  : 2H, br.d,  $\delta$  4.2、CH<sub>2</sub> : 4H, s,  $\delta$  3.0、6  $\alpha$ , 6  $\beta$  : 2H, multi,  $\delta$  2.8、4H : 1H, multi,  $\delta$  2.6、COCH<sub>2</sub> : 2H, br.s,  $\delta$  2.1、CH<sub>3</sub> : 3H,  $\delta$  1.8、CH<sub>2</sub> : 8H,  $\delta$  1.2 ~

1.5。

実施例 3 [N-イミノビオチニル-N'-メタクロイルトリメチレンアミド (化合物 C) の合成]

実施例 2 の N-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩 18 g の代わりに N-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド臭化水素酸塩 18 g を、ビオチン 24 g の代わりにイミノビオチン 24 g をそれぞれ用いた以外は実施例 2 と全く同様にして、N-イミノビオチニル-N'-メタクロイルトリメチレンアミド (化合物 C) の臭化水素酸塩 15 g を得た (収率 42 %)。

NMR 分析で目的化合物 C の臭化水素酸塩を良く指示した (inDMSO)。

NH, NH: 2H, d,  $\delta$  8.0 ~ 8.2, CONH: 2H, br.s,  $\delta$  7.9, =NH · HBr: 2H, s,  $\delta$  7.5, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>: 2H, s,  $\delta$  5.6,  $\delta$  5.3, 3a, 6a: 2H, br.d,  $\delta$  4.2, CH<sub>2</sub>: 4H, s,  $\delta$  3.0, 6 $\alpha$ , 6 $\beta$ : 2H, multi,  $\delta$  2.8, 4H: 1H, multi,  $\delta$  2.6, COCH<sub>2</sub>: 2H, br.s,  $\delta$  2.1, CH<sub>3</sub>: 3H,  $\delta$  1.8, CH<sub>2</sub>: 8H,  $\delta$  1.2 ~ 1.5。

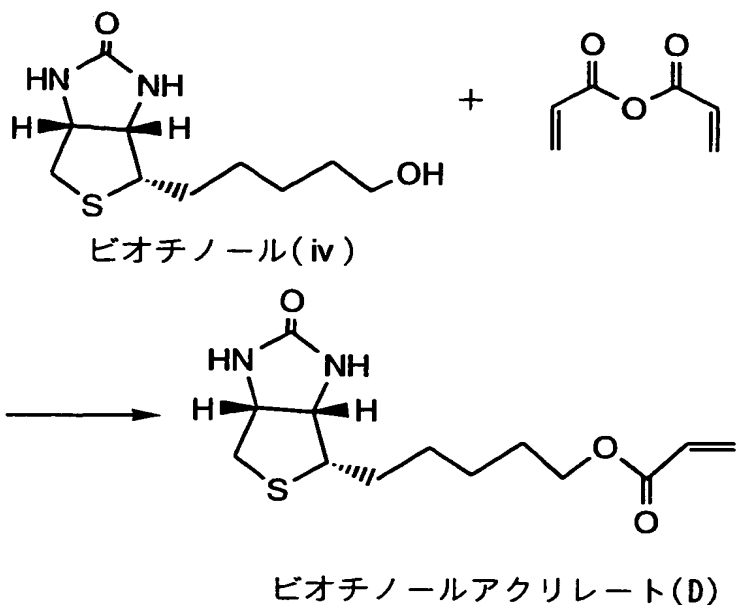
実施例 4 [ビオチノールアクリレート (化合物 D) の合成]

4-1) ビオチン (化合物 i) からビオチノール (化合物 iv) の合成

リチウムアルミニウムハイドライド 1.96g (51.64mmol) を脱水エーテル 250ml に少しずつ入れて攪拌し、この中にビオチン (化合物 i) 1.96g (8.02mmol) をピリジン 50ml に溶かした熱い溶液を滴下し、室温にて 30 分攪拌した。その後 30 分還流し、反応を終了した。過剰のリチウムアルミニウムハイドライドは水等にてつぶし、ピリジンを減圧下除去した。残査に 6N 塩酸を入れ、pH をほぼ 2 に合わせた後クロロホルムにて抽出し、溶媒を除去すると、白色粉末を得た。メタノールから再結晶してビオチノール (化合物 iv) 1.6mg を得た (収率 85 %)。

4-2) ビオチノール (化合物 iv) とアクリル化剤の反応によるビオチノールアクリレート (化合物 D) の合成

## 反応式 1



バイオチノール（化合物 iv）230mg（1mmol）、トリエチルアミン 273mg（3mmol）、無水アクリル酸 252mg（2mmol）、ジメチルアミノピリジン 12.9mg（0.1mmol）及びジクロロメタン 5ml を室温にて混合した後還流し、反応溶液を  $\text{NaHCO}_3$  飽和水溶液、飽和食塩水、水にて洗い反応を終了した。溶媒にて抽出し、クロロホルム-メタノール混合溶媒を展開溶媒としてカラムクロマトを行ったところ、バイオチノールアクリレート（化合物 D）170mg を白色粉末として得た（収率 59 %：バイオチンメチルエステルからバイオチノールアクリレートまで収率約 50 %）。

NMR 分析及び質量分析（MS）の結果は目的化合物 D を良く指示した

NMR (in  $\text{CDCl}_3$ ) H1, H2, H3:  $\delta$  6.4 ~  $\delta$  6.1、H3: 1H, d,  $\delta$  5.9、NH: 1H, s,  $\delta$  5.6,  $\delta$  5.1、6a: 1H, multi,  $\delta$  4.5、3a: 1H, tri,  $\delta$  4.3、 $\text{OCH}_2$ : 2H, tri,  $\delta$  4.1、H4: 1H, multi,  $\delta$  3.1、6  $\alpha$ : 1H, quart,  $\delta$  2.9、6  $\beta$ : 1H, d,  $\delta$  2.6、 $\text{CH}_2$ : 8H,  $\delta$  1~1.6。

MS 質量 = 285

実施例 5〔バイオチノールメタクリレート（化合物 E）の合成〕

実施例 4 で得たビオチノール (化合物 iv) 550mg (2.3mmol)、トリエチルアミン (Et<sub>3</sub>N) 1.4g (7mmol)、無水メタクリル酸 1.6g (4.6mmol)、ジメチルアミノピリジン 60mg (0.5mmol) 及びジクロロメタン (溶媒) 4ml を室温にて混合した後還流し、NaHCO<sub>3</sub> 飽和水溶液にて洗い反応を終了した。クロロホルムにて抽出し、クロロホルム-メタノール混合溶媒にてカラムクロマトを行ったところ、ビオチノールメタクリレート (化合物 E) 630mg を白色粉末として得た (収率 40%)。

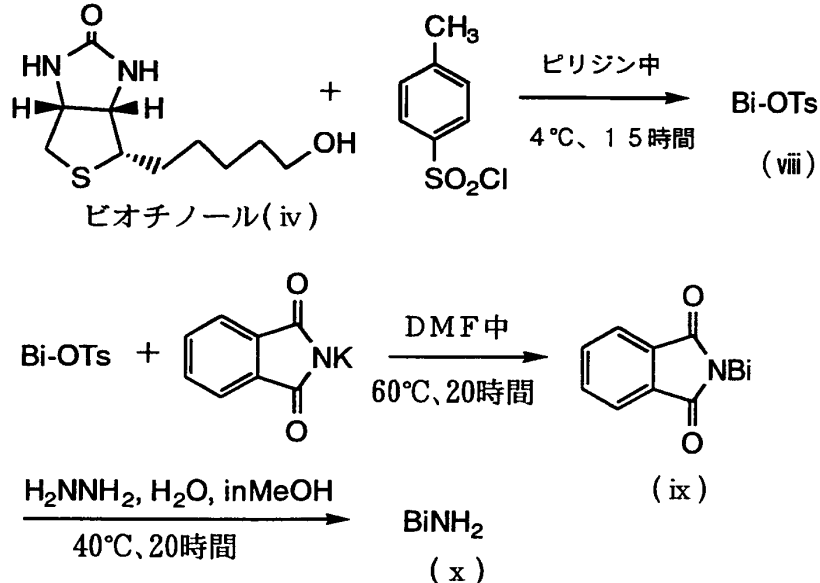
NMR 分析及び質量分析 (MS) の結果は目的化合物 E を良く指示した。

NMR (inDMSO) NH: 1H, s,  $\delta$  6.4、NH: 1H, s,  $\delta$  6.3、H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>: 1H, s,  $\delta$  6.0 ~5.6、6 $\alpha$ : 1H, multi,  $\delta$  4.3、3 $\alpha$ , OCH<sub>2</sub>: 3H, multi,  $\delta$  4.1、6 $\alpha$ : 1H, quart,  $\delta$  3.1、6 $\beta$ : 1H, d,  $\delta$  2.8、CH<sub>3</sub>: 3H, s,  $\delta$  1.9、CH<sub>2</sub>: 8H,  $\delta$  1~1.6。

MS 質量 = 300

#### 実施例 6 [ビオチンアミンアクリルアミド (化合物 F) の合成]

##### 反応式 2



##### 6-1) ビオチノールトシレート (化合物 viii) の合成

0 °C にて p-トルエン磺ォニルクロライド 2400mg (12.6mmol) を混合したドライピリ

ジン 25ml 溶液に実施例 2 で得たビオチノール (化合物 iv) 1g (4.3mmol)を入れた。その後 0 °C にて 15 時間放置した。反応後、反応液を水にあげ、ジクロロメタンにて抽出した後溶媒を除去し、ビオチノールトシレート (化合物 viii) 900mg を得た (収率 54 %)。

#### 6-2) ビオチンフタルイミド誘導体 (化合物 ix) の合成

上記で得たビオチノールトシレート (化合物 viii) 900mg (2.3mmol) を脱水ジメチルホルムアミド (DMF) 14ml に溶かし、フタルイミドカリウム塩 481mg (2.6mmol) をいれて 60 °C にて 20 時間加熱した。反応終了後、水をいれるとフタルイミド誘導体が析出した。これをろ過し乾燥して、ビオチンフタルイミド誘導体 (化合物 ix) 570mg を得た (収率 68%)。

#### 6-3) ビオチンアミン (化合物 x) の合成

メタノールにゆっくりヒドラジンモノ水和物 626mg を入れ (0.5M、MeOH 溶液にする)、さらに上記で得られたビオチンフタルイミド誘導体 (化合物 ix) 570mg を入れた。チッソ雰囲気下 40 °C にて 20 時間反応させたところ、ビオチンアミン (BiNH<sub>2</sub>) 未精製物 (化合物 x) 411mg を得た (収率ほぼ 100 %)。

#### 6-4) ビオチンアミンアクリルアミド (化合物 F) の合成

上記ビオチンアミン (化合物 x) を塩酸により塩酸塩にして得たビオチンアミン塩酸塩 133mg (0.5mmol) とアクリル酸 36  $\mu$  l (0.5mmol) をジメチルホルムアミド (DMF; 溶媒) 4ml に溶かし、0 °C に保ち、攪拌した。これにジフェニルリン酸アジド (DPPA) 165  $\mu$  l (0.6mmol) を滴下し 0 °C に保った。さらにトリエチルアミン 208  $\mu$  l (1.5 mmol) を 1ml の DMF に溶かした溶液を滴下し 0 °C にて 2 ~ 4 時間攪拌した。

その後室温に保ち終夜反応させた。反応終了後 DMF を飛ばし、クロロホルムにて抽出し、1N 塩酸と NaHCO<sub>3</sub>、水にてクロロホルム層を洗い、溶媒を除去した。残査を THF - n-ヘキサン混合溶媒に溶かしビオチンアミンアクリルアミド (化合物 F) 40mg (収率 25 %) を沈澱物として得た。

NMR 分析及び質量分析 (MS) の結果は目的化合物 F を良く指示した。

NMR (in DMSO) CONH : 1H, s,  $\delta$  7.9、H1, H2, H3 : 3H, multi,  $\delta$  7.5~6.9、NH, NH : 1H, s,  $\delta$  6.4,  $\delta$  6.3、6a : 1H, multi,  $\delta$  4.3、3a : 1H, multi,  $\delta$  4.1、

CONHCH<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>: 3H, multi,  $\delta$  3.5~3.0、6  $\alpha$ : 1H, quart,  $\delta$  2.8、6  $\beta$ : 1H, d,  $\delta$  2.5、CH<sub>2</sub>: 8H,  $\delta$  1~1.6。

MS 質量 = 284

#### 実施例7〔ビオチンアミンメタクリルアミド（化合物G）の合成〕

ビオチンアミン塩酸塩 100mg (0.38mmol)とメタクリル酸 38  $\mu$  l(0.43mmol)を DMF (溶媒) 5ml に溶かし、0℃に保ち攪拌した。これに DPPA130  $\mu$  l(0.5mmol)を滴下し 0℃に保った。さらにトリエチルアミン 156  $\mu$  l (1.1mmol)を 1ml の DMF に溶かした溶液を滴下し 0℃にて 2 ~ 4 時間攪拌した。その後室温に保ち終夜反応させた。反応終了後 DMF を減圧下除去し、クロロホルムにて溶解し、1N 塩酸と NaHCO<sub>3</sub>、水にてクロロホルム層を洗い、溶媒を除去した。これを THF-n ヘキサン混合溶媒に溶かしビオチンアミンメタクリルアミド（化合物G）40mgを沈澱物として得た（収率 35 %）。

NMR分析及び質量分析（MS）の結果は目的化合物Gを良く指示した。

CONH: 1H, s,  $\delta$  7.9、H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>: 3H, multi,  $\delta$  7.5~6.9、NH, NH: 1H, s,  $\delta$  6.4,  $\delta$  6.3、6a: 1H, multi,  $\delta$  4.3、3a: 1H, multi,  $\delta$  4.1、CONHCH<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>: 3H, multi,  $\delta$  3.5~3.0、6  $\alpha$ : 1H, quart,  $\delta$  2.8、6  $\beta$ : 1H, d,  $\delta$  2.5、CH<sub>2</sub>: 6H,  $\delta$  1~1.6。

MS 質量 = 299

#### 実施例8〔ノルビオチンアミンアクリルアミド（化合物H）の合成〕

ノルビオチンアミン塩酸塩（Merck 製）125mg (0.5mmol)とアクリル酸 36  $\mu$  l (0.5mmol)を ジメチルホルムアミド（DMF；溶媒）3ml に溶かし、0℃に保ち、攪拌した。これにジフェニルリン酸アジド(DPPA)165  $\mu$  l (0.6mmol)を滴下し 0℃に保った。さらにトリエチルアミン 208  $\mu$  l(1.5 mmol)を 1ml の DMF に溶かした溶液を滴下し 0℃にて 2 ~ 4 時間攪拌した。

その後室温に保ち終夜反応させた。反応終了後 DMF を飛ばし、クロロホルムにて抽出し、1N 塩酸と NaHCO<sub>3</sub>、水にてクロロホルム層を洗い、溶媒を除去した。残査を THF-n

ヘキサン混合溶媒に溶かしノルビオチンアミンアクリルアミド (化合物H)30mg を沈殿物として得た (収率 20 % )。

NMR分析は目的化合物Hを良く指示した (inDMSO)

NMR (inDMSO) CONH : 1H, s,  $\delta$  7.8、NH, NH : 1H, s,  $\delta$  6.4,  $\delta$  6.3、H1, H2 : 1H, s,  $\delta$  5.6,  $\delta$  5.3、6a : 1H, multi,  $\delta$  4.3、3a : 1H, multi,  $\delta$  4.1、CONHCH<sub>2</sub>, H4 : 3H, multi,  $\delta$  3.5 ~ 3.0、6  $\alpha$  : 1H, quart,  $\delta$  2.8、6  $\beta$  : 1H, d,  $\delta$  2.5、CH<sub>3</sub> : 3H,  $\delta$  1.8、CH<sub>2</sub> : 8H,  $\delta$  1 ~ 1.6。

#### 実施例 9 [ノルビオチンアミンメタクリルアミド (化合物J) の合成]

ノルビオチンアミン塩酸塩 94mg (0.38mmol)とメタクリル酸 38  $\mu$  l(0.43mmol)をDMF (溶媒) 3ml に溶かし、0 °Cに保ち、攪拌した。これに DPPA130  $\mu$  l(0.5mmol)を滴下し0 °Cに保った。さらにトリエチルアミン 156  $\mu$  l (1.1mmol)を 1ml の DMF に溶かした溶液を滴下し 0 °Cにて 2 ~ 4 時間攪拌した。その後室温に保ち終夜反応させた。反応終了後 DMF を除去し、クロロホルムにて抽出後、1N 塩酸と NaHCO<sub>3</sub>、水にてクロロホルム層を洗い、溶媒を除去した。これを THF-n ヘキサン混合溶媒に溶かしノルビオチンアミンメタクリルアミド (化合物J) 30mg を沈殿物として得た (収率 30 % )。

NMR分析は目的化合物Jを良く指示した (inDMSO)

CONH : 1H, s,  $\delta$  7.8、NH, NH : 2H, d,  $\delta$  6.4、H1, H2 : 1H, s,  $\delta$  5.6,  $\delta$  5.3、6a : 1H, multi,  $\delta$  4.3、3a : 1H, multi,  $\delta$  4.1、CONHCH<sub>2</sub>, H4 : 3H, multi,  $\delta$  3.5~3.0、6  $\alpha$  : 1H, quart,  $\delta$  2.8、6  $\beta$  : 1H, d,  $\delta$  2.5、CH<sub>3</sub> : 3H,  $\delta$  1.8、CH<sub>2</sub> : 6H,  $\delta$  1~1.6。

#### 実施例 10 [ビオチノールメタクロイルカルバメート (化合物K) の合成]

メタクロイルイソシアネート (化合物 vii) 266mg を塩化メチレン 20ml に溶かし0 °Cに保ち、ビオチノール 500mg を含む塩化メチレン溶液を徐々に滴下し、1 時間攪拌し、更に室温で 10 時間攪拌した。

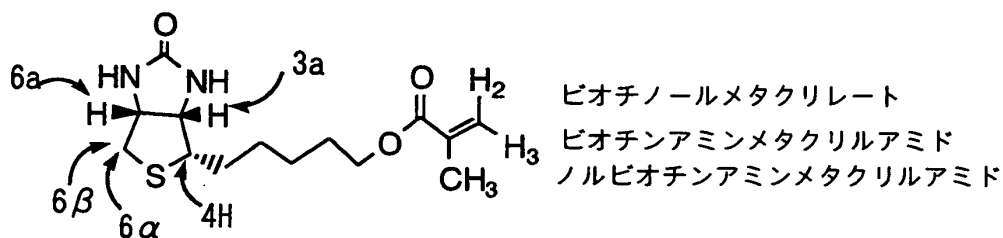
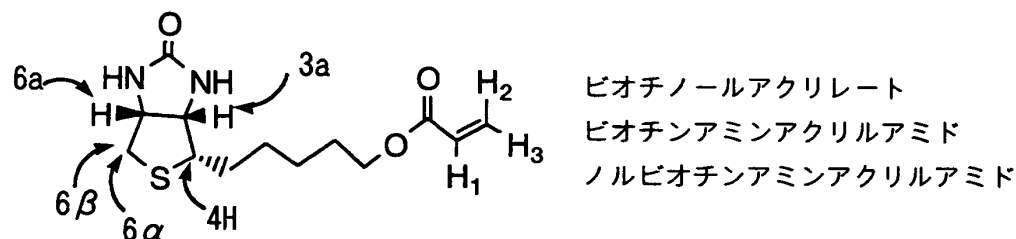
反応終了後、飽和重曹水 30ml を加え、クロロホルムにて抽出した。クロロホルム層を

減圧下溶媒を留去し、残査をシリカゲルを用いてカラムクロマトを行った。得られた粗目的物をイソプロパノールを用いて再結晶を行い、ビオチノールメタクロイルカルバメート（化合物K）120mgを得た（収率16%）。

NMR分析で目的化合物Kを良く指示した。

CONHCO : 1H, s,  $\delta$  8.4 ~ 8.5、NH : 1H, s,  $\delta$  6.2、H2, H3 : 1H, s,  $\delta$  5.8,  $\delta$  5.6、NH : 1H, s,  $\delta$  5.5、6a : 1H, multi,  $\delta$  4.5、3a : 1H, multi,  $\delta$  4.3、OCH<sub>2</sub> : 2H, tri,  $\delta$  4.2、4H : 1H, multi,  $\delta$  3.2、6 $\alpha$  : 1H, quart,  $\delta$  2.9、6 $\beta$  : 1H, d,  $\delta$  2.7、CH<sub>3</sub> : 3H, s,  $\delta$  1.9、CH<sub>2</sub> : 8H,  $\delta$  1.2 ~ 1.7。

尚、上記NMRデータの各プロトン表示は下記の通りである。



（アミドは酸素原子の代わりにNHに変わる）

#### 実施例11～15〔アクリルアミド／ビオチノールアクリレート共重合体の合成〕

アクリルアミド 710mg、ビオチノールアクリレート（化合物B）142mg、ジメチルスルフォキシド 10ml 及び2, 2'-アゾビス（2, 4-ジメチルバレロニトリル）8.5mgを混合し、チッソ雰囲気下脱気した。その後徐々に温度を昇温し、攪拌しながら45℃にて反応を2～3時間行った。最後に65℃付近にまで昇温して反応を完結させた。反応系に溶媒（ジメチルスルフォキシド）を数ml加え、エタノールに注ぐと沈殿を生じた（収

率 95%以上)。沈殿は乾燥した後、水に溶解し透析した。水を除去してポリマーの精製を終了した。

上記アクリルアミドとピオチノールアクリレートとの仕込み比（モル比）を種々変え、開始剤を２種類（上記開始剤２，２′-アゾビス（２，４-ジメチルバレロニトリルの代わりに、アゾビスイソブチロニトリルを使用。各々の反応温度は異なり分子量も異なる）使用して重合したポリマーの結果を表－２に示す。

表－２ アクリルアミドとピオチノールアクリレートの共重合高分子の仕込み比（モル比）を変化した場合に、測定溶液の透過率が５０％を示す温度

2,2′-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)を開始剤とした場合					アゾイソブチロニトリルを開始剤とした場合				
	仕込み比 AAm:BA	透過率 50%の溶液温度 (°C)		重量平均 分子量		仕込み比 AAm:BA	透過率 50%の溶液温度 (°C)		重量平均 分子量
実施例 11	30 : 1	2 (水中)	2 (生食中)	140,000	実施例 14	20 : 1	12 (水中)	~5 (生食中)	32,000
実施例 12	20 : 1	18 (水中)	15 (生食中)	89,000	実施例 15	10 : 1	45 (水中)	50 (生食中)	18,000
実施例 13	15 : 1	37 (水中)	28 (生食中)	98,000					

- ・分子量測定はTOSOのG4000PWを使用した。
- ・生食中：生理的食塩水中にて透過率を測定した場合
- ・水中：蒸留水中にて透過率を測定した場合。
- ・仕込み比：モル比
- ・2,2′-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)使用の場合の重合温度は45°C～65°C
- ・アゾビスイソブチロニトリル使用の場合の重合温度は80°C
- ・実施例11、12の透過率測定溶液濃度：6mg/ml
- ・実施例13の水中透過率測定溶液濃度：10mg/ml
- ・実施例13の生食中透過率測定溶液濃度：6mg/ml
- ・実施例14の透過率測定溶液濃度：22.4mg/ml
- ・実施例15の透過率測定溶液濃度：6mg/ml
- ・AAm：アクリルアミド                      ・BA：ピオチノールアクリレート

また、アクリルアミド／ピオチノールアクリレート共重合体（仕込みモル比20：1）のNMRデータ（inDMSO）は以下の通りであった。

4 ピーク :  $\delta$  7.5 ~ 6.5、s :  $\delta$  6.4、s :  $\delta$  4.3、s :  $\delta$  4.1、s :  $\delta$  3.1、broad :  $\delta$  2.8、broad :  $\delta$  2.1、broad :  $\delta$  1.5 ~ 1.3。

尚、仕込み比（モル比）が変化しても下記と同様のピークを示した。更に、ビオチノールアクリレートホモポリマーの場合は、 $\delta$  7.5 ~ 6.5 部分のピークが約 1 本になり、その他は共重合体と同じところにピークが見られた。

更に、上記アクリルアミド／ビオチノールアクリレート共重合体（仕込みモル比 20 : 1）の上限臨界溶液温度（UCST）を図 1 ~ 図 3 に示す。

即ち、図 1 は昇温時と降温時の温度と透過率の関係を示す図であり、上記アクリルアミド／ビオチノールアクリレート共重合体（仕込みモル比 20 : 1）の水中における UCST（コポリマー濃度 10 mg / ml）を示す。

図 2 は生理的食塩水中におけるアビジンを認識したコポリマーの透過率変化（降温時）を示す図であり、アクリルアミド／ビオチノールアクリレート共重合体（仕込み比 20）の生理的食塩水中（コポリマー濃度 6mg/ml）におけるアビジン認識能と UCST の変化（降温時の透過率のみ）を示す。

図 3 は、N-イソプロピルアクリルアミドとビオチノールアクリレートコポリマーのアビジン添加による LCST 変化（降温時）を示す図であり、上記コポリマーを含有する水溶液中にアビジンを添加すると、その透過率変化が少なくなり、コポリマーが溶け易くなることが判る。

このように、本発明のビオチンモノマーを共重合成分として含有する共重合体は、温度刺激応答材料としての特性を有することがわかる。

#### 実施例 16 [ビオチン固定化ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドの合成]

300 ml 容のフラスコ内に N-イソプロピルアクリルアミド 0.488 g、N-メタクロイル-N'-ビオチニルプロピレンジアミン 0.159 g および蒸留水 94 ml を添加し室温でよく攪拌した。そこに 0.1 g の過硫酸カリウムを添加し、室温で 6 時間攪拌した。得られた溶液を一昼夜透析し、LCST を有するビオチン化ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド溶液を

得た。得られた溶液の下限臨界溶液温度(LCST)を測定したところ、31 °Cであった。この LCST は生理食塩水中や 100mM のリン酸緩衝液(pH7.0)中でもほとんど変化しなかった。さらに LCST 以上に加温したポリマーの凝集能力は非常に高く、下層に沈殿し、デカンテーションによりポリマーを回収することができた。

尚、LCST は可視光の透過率を用いて求めた。

#### 実施例 1 7 [水溶液中からのアビジンの分離]

実施例 1 6 で得られたポリ-N-イソプロピルアクリルアミド 水溶液 50  $\mu$ l、1.0% アビジン溶液 50  $\mu$ l、1.0M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0) 100  $\mu$ l、蒸留水 800  $\mu$ l を試験中で良く混合した後、氷水中に置き溶液の温度が LCST 以下にした。凝集物をデカンテーションにより回収し、上清部分 100  $\mu$ l を取り出し、SDS による変性処理後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により上清からアビジンに対応するバンドが無くなっていることを確認した。

#### 実施例 1 8 [卵白中からのアビジンの特異的分離]

実施例 1 6 で得られた LCST を有するポリ-N-イソプロピルアクリルアミド水溶液 50  $\mu$ l、1.0%アビジン溶液 50  $\mu$ l、1.0M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)100  $\mu$ l、蒸留水 450  $\mu$ l、2.5%の卵白溶液 400  $\mu$ l を試験中で良く混合した後、氷水中に置き溶液の温度が LCST 以上にした。凝集物をデカンテーションにより回収し、上清部分 100  $\mu$ l を取り出し、SDS による変性処理後、SDS-PAGE により上清からアビジンに対応するバンドのみが無くなっていることを確認した。

#### 実施例 1 9 [[ビオチン固定化ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドへのアビジン化酵素の固定化]

実施例 1 6 で得られたポリ-N-イソプロピルアクリルアミド水溶液 100  $\mu$ l、市販のアビジン化ペルオキシダーゼ溶液(1mg/ml)1000  $\mu$ l、1.0M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)100  $\mu$ l 及び蒸留水 700  $\mu$ l を添加し、良く混合した。得られた溶液を冷却し、

デカンテーションにより凝集物を回収し、上清 1900  $\mu$ l を取り除いた後、新たに 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1900  $\mu$ l を添加し、アビジン化ペルオキシダーゼを固定化した LCST を示すポリ-N-イソプロピルアクリルアミド水溶液を調製した。この溶液は LCST 以下では溶解し、LCST 以上では凝集した。溶液の温度を恒温槽により変化させ、溶解、凝集およびデカンテーションによる回収の操作を行い、それぞれの上清のペルオキシダーゼの活性を下記に示すペルオキシダーゼの活性測定法により測定した。なお、デカンテーションによる回収後は毎回上清 1900  $\mu$ l を取り除き、新たに 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1900  $\mu$ l を添加した。

(ペルオキシダーゼ活性測定法)

100mM 過酸化水素 100  $\mu$ l、50mM フェノール、50mM 4-アミノアンチピリン 100  $\mu$ l、1.0M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 100  $\mu$ l、蒸留水 580  $\mu$ l を吸光度計のセル内で予め混合し、そこへサンプル 20  $\mu$ l を添加し、再び良く混合した後、生成物を 500nm の吸収の増加により測定した。なお、反応は 30℃で行った。

上記の方法により繰り返し凝集、溶解を行った場合の上清の酵素活性を測定した結果を下記表-3に示す。なお、酵素活性は最初の溶解時の活性を 100 とした場合の比活性で示した。

表-3

繰り返し数 (回)	ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド水溶液のペルオキシダーゼ活性(%)	ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド凝集、回収後の上清のペルオキシダーゼ活性(%)
1	100	8
2	99	4
3	99	3
5	98	3
10	100	2
20	102	0

この結果よりポリ-N-イソプロピルアクリルアミドに固定化されたアビジン化ペルオキシダーゼはポリ-N-イソプロピルアクリルアミドと共に溶解、凝集を繰り返しかつ同作業

の繰り返しによっても活性は無くならないことが明らかとなった。

#### 実施例 20 [アビジン化 ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドへのビオチン化酵素の固定]

まず、アビジンのビオチン結合サイト 3 カ所が空いている状態のアビジン化 ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを得るため、実施例 1 で得られたポリ-N-イソプロピルアクリルアミド水溶液 50  $\mu$ l に 1.0%アビジン溶液 500  $\mu$ l、1.0M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 100  $\mu$ l、蒸留水 350  $\mu$ l を試験中で良く混合した後、40  $^{\circ}$ C の恒温槽中に置き溶液の温度を LCST 以上にした。凝集物をデカンテーションにより回収し、ポリマーとの結合部位以外のビオチン結合サイトが空いているアビジン化ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを得た。このポリ-N-イソプロピルアクリルアミド水溶液 100  $\mu$ l、市販のビオチン化ペルオキシダーゼ溶液(1mg/ml)1000  $\mu$ l、1.0M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 100  $\mu$ l 及び蒸留水 700  $\mu$ l を添加し、良く混合した。得られた溶液を冷却し、デカンテーションにより凝集物を回収し、上清 1900  $\mu$ l を取り除いた後、新たに 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1900  $\mu$ l を添加し、ビオチン化ペルオキシダーゼを固定化したアビジン化 ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを調製した。このポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを使って、実施例 19 と同様に溶解、凝集回収を繰り返し、上清の酵素活性を測定した結果を下記表-4 に示す。なお、酵素活性についても同様に最初の溶解時の活性を 100 とした場合の比活性で示した。

表-4

繰り返し数 (回)	ポリ-N-イソプロピルア クリルアミド水溶液のペ ルオキシダーゼ活性(%)	ポリ-N-イソプロピルアクリ ルアミド凝集、回収後の上清 のペルオキシダーゼ活性(%)
1	100	1
2	101	1
3	100	1
5	98	0
10	97	0
20	95	0

この結果よりアビジンの固定化されたポリ-N-イソプロピルアクリルアミドに結合したビオチン化ペルオキシダーゼはポリ-N-イソプロピルアクリルアミドと共に溶解、凝集を繰り返しかつ同作業の繰り返しによっても活性は無くならないことが明らかとなった。

#### 実施例 2 1 [ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドへの分子シャペロンの固定化]

市販のビオチン化されたヒートショックプロテイン HSP70 を 100mM のリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)によく混合させた後、5  $\mu$  l を取り出し、変性処理後、SDS-PAGE により HSP70 のバンドを確認した。続いて実施例 2 0 で調製した、ポリマーとの結合部位以外のビオチン結合サイトが空いているアビジン化ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド水溶液 50  $\mu$  l を加え、良く混合したのち、実施例 1 7 と同様に溶液を加熱して本化合物を凝集後、デカンテーションにより回収し、上清の HSP70 を同様に SDS-PAGE により確認したところ上清には HSP70 は無く、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドに固定化されたアビジンと結合していることが確認された。

#### 実施例 2 2 [微生物の分離濃縮方法]

市販のビオチン化サルモネラ抗体を実施例 1 9 と同様にポリ-N-イソプロピルアクリルアミドに固定化した。固定化したことは SDS-PAGE を用い確認を行った。続いてこのサルモネラ菌が 1 個/ $\mu$  l になるように調整した菌けん濁液 20  $\mu$  l にこのポリ-N-イソプロピルアクリルアミド水溶液 1  $\mu$  l を添加してよく攪拌後、実施例 1 6 と同様に溶液を加熱し、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを凝集後、デカンテーションにより回収し、上清を取り除き 1  $\mu$  l の溶液とした。この溶液を予め滅菌し、50  $^{\circ}$ C にインキュベートしていたブレインハートインフュージョン寒天培地 20  $\mu$  l に添加し、すばやく混合後、シャーレに広げ、寒天が固まるまで放冷し、37  $^{\circ}$ C で 48 時間インキュベートした。48 時間後のコロニー数を計測した結果を下記表-5 に示した。また、これら総ての操作はクリーンベンチ内にて行った。また、対照として、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを添加せず、最初に調整した菌けん濁液 1  $\mu$  l 中の菌数を同様に測定した。

表-5

	対照	ポリ-N-イソプロピル アクリルアミド使用
コロニー数	1	21

この結果より、サルモネラ菌は本発明のポリ-N-イソプロピルアクリルアミドにより濃縮されていることが明らかである。

### 実施例 23 [ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドへの核酸の固定化]

市販のビオチン化ラベルされた DNA 断片 500  $\mu$ l (50 ~ 1000bp) に蒸留水 450  $\mu$ l、実施例 20 で調製したポリマーとの結合部位以外のビオチン結合サイトが空いているアビジン化ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド水溶液 50  $\mu$ l を加え、良く混合したのち、実施例 17 と同様に溶液を加熱し、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを凝集後、デカンテーションにより回収し、上清の DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により確認したところ、いずれの DNA 断片もポリ-N-イソプロピルアクリルアミドに結合していることが示唆された。RNA についても同様の実験を行い、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドへの結合を確認した。

### 産業上の利用可能性

本発明の重合性ビオチン誘導体（ビオチンモノマー）は重合性が高く、本モノマーを用いることにより、種々の分野に適用可能なビオチン成分を含有する高分子誘導体が容易に製造できる。

特に本発明によれば、他のモノマーとの共重合により、各モノマーの機能をそなえた高分子の合成、設計が可能であり、特に、ビオチン成分のビオチン-アビジン結合性に起因する有効性を利用しつつ、他の共重合成分や添加剤を工夫することにより、広範な範囲に適用可能な種々の多官能性、多重機能性の高分子を合成、設計することが可能となる。

例えば、ビオチンモノマーとアクリルアミドまたはメタクリルアミドとの共重合体は、

UCSTを水溶液中及び生理食塩水中で示すため、刺激応答材料としても魅力ある製品となる。また、ビオチンモノマーとLCSTを示す高分子のモノマーとの共重合体は、LCST以上で非常に高い凝集力を有するため、反応を行うときは水溶液中で均一系で反応を行い、反応終了後、昇温操作でリガンド固定化高分子が凝集し、リガンドの固定化した高分子を濾過により容易に回収することができる。

これらの本発明の熱応答性高分子を用いることにより、優れた分離剤、検査薬、固定化酵素、変性蛋白改質剤等を得ることができる。

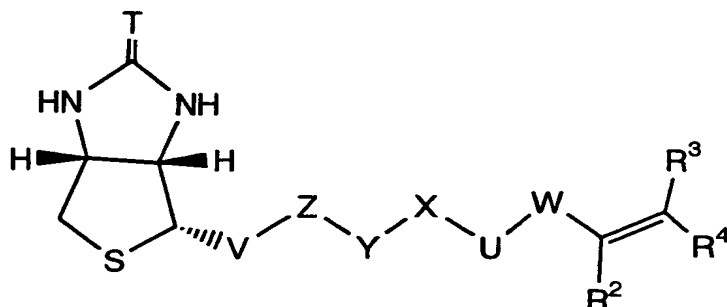
本発明の重合性ビチオン誘導体は、生体機能を有する高分子材料として有用なモノマーであり、その用途は、免疫アッセイ、バイオセンサー、DNA操作、分離材、臨床療法など多岐にわたる。それは、ビオチンそのものがアビジンを分子認識するだけでなく、その他多くの抗体やコラーゲンなども認識する生体機能材料であるためであり、例えばアビジンを介したサンドイッチ構造等により種々応用できる。

更に、本発明の重合性ビオチン誘導体を用いて得られる高分子化合物は、工業的に製造可能であり、優れた経済性及び効率性を有する。

## 請 求 の 範 囲

1. 下記一般式 (I) で示される重合性ビオチン誘導体。

一般式 (I)



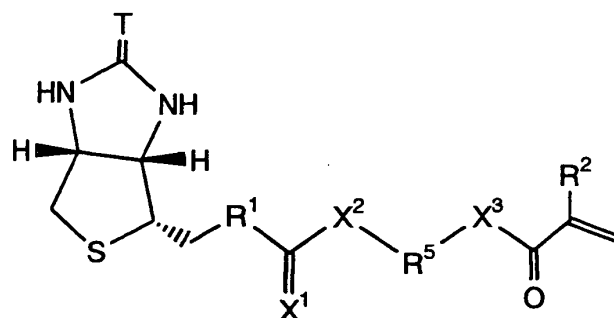
式 (I) 中、 $R^2$  は水素原子又はアルキル基を示す。 $R^3$  及び  $R^4$  はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基又はアリール基を示す。

T は酸素原子又は =NH 基を表す。

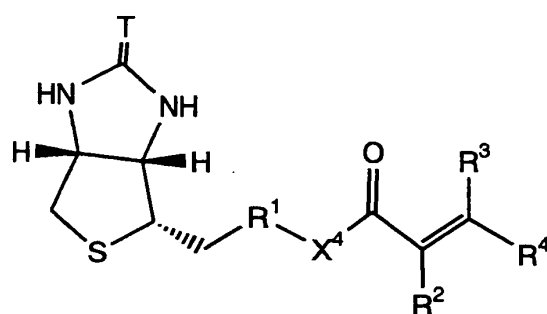
W は単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基もしくは炭素数 1～5 のアルキレン基を示す。U は単結合又は -NH- 基を示す。X は単結合又は炭素数 1～8 の炭化水素結合、酸素原子もしくは -NH- 基を示す。Y は単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基、-NH- 基、1,2-ジオキシエチレン基もしくは 1,2-ジアミノエチレン基を示す。Z は単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基、炭素数 1～5 のアルキレン基、酸素原子もしくは -NH- 基を示す。V は単結合又は炭素数 1～5 のアルキレン基を示す。

2. 下記一般式 (Ia) ～ (Ic) で示される重合性ビオチン誘導体。

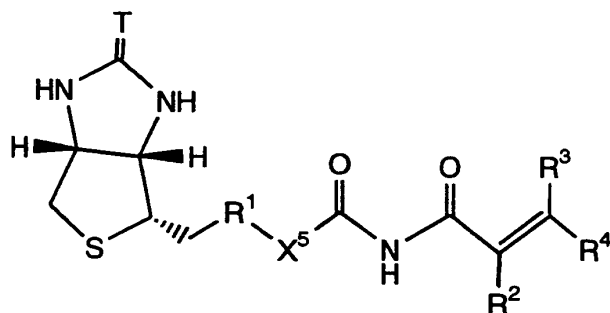
一般式 (I a)



一般式 (I b)



一般式 (I c)



一般式 (I a) ~ (I c) 中、 $R^1$ は単結合又は炭素数 1 ~ 4 のアルキレン基を示し、 $R^5$ は炭素数 2 又は 3 のアルキレン基を示す。

$X^1$ は酸素原子又は硫黄原子を示し、 $X^2 \sim X^5$ はそれぞれ独立に、酸素原子又は -N H- 基を示す。

T、 $R^2$ 、 $R^3$ 及び $R^4$ はそれぞれ請求項 1 に記載される通りである。

3. 請求の範囲第 1 項記載の一般式 (I) で示される重合性ビオチン誘導体を重合又は他

の共重合成分と共重合することを特徴とするビオチン成分を含有する高分子化合物の製造方法。

4. 請求の範囲第1項記載の一般式(I)で示される重合性ビオチン誘導体を重合成分又は共重合成分として含有するビオチン成分を含有する高分子化合物。
5. 請求の範囲第1項記載の一般式(I)で示される重合性ビオチン誘導体と、アクリルアミド又はメタクリルアミドとを共重合成分として含有する、水溶液中でUCST(上限臨界溶液温度)を有する高分子化合物。
6. 請求項の範囲第1項記載の一般式(I)で示される重合性ビオチン誘導体と、水溶液中でLCST(下限臨界溶液温度)を有する高分子のモノマー成分とを共重合成分として含有する、水溶液中でLCSTを有する高分子化合物。
7. 親水性モノマー又は疎水性モノマーを更に共重合成分として含有する請求の範囲第4項から第6項のいずれかに記載の高分子化合物。
8. アビジン固定化抗体またはアビジンの結合部位を介してビオチン化抗体を固定化した請求の範囲第4項から第7項のいずれかに記載の高分子化合物。
9. 請求の範囲第8項記載の高分子化合物を用いた分離剤。
10. 請求の範囲第8項記載の高分子化合物を用いた微生物の分離又は濃縮による微生物検査薬。
11. 請求の範囲第8項記載の高分子化合物を用いた固定化酵素。
12. アビジン固定化ヒートショックプロテインもしくはビオチン化ヒートショックプロテインをアビジンの結合部位を介して固定化した請求の範囲第4項から第7項のいずれかに記載の高分子誘導体。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05113

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07D495/04, C08F20/54, C08F20/38, C12N11/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07D495/04, C08F20/54, C08F20/38, C12N11/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tarasow T. et al., "Characteristics of an RNA Diels-Alderase Active Site.", J. Am. Chem. Soc., Vol.121, No.15 (received at Japan Science and Technology Corp., in April 1999) pp.3614-3617, Table 1 Substrate 9	1, 2
X	NELSON P. et al., "Convenient preparation of new C-5 biotinylated dUTP derivative.", Nucleosides Nucleotides, Vol.5, No.3 (1986) pp.233-241, SCHEME I Substrate 3	1, 2
X Y	WO, 86/1899, A1 (Unilever PLC), 27 March, 1986 (27.03.86), whole document, especially p.11, lines 2-4 & EP, 178790, A1 & JP, 62-500198, A	1-4 5-12
X Y	EP, 226470, A2 (Unilever PLC), 24 June, 1987 (24.06.87) & JP, 62-156561, A	1-4 5-12
X Y	EP, 914835, A2 (Alomone Labs Ltd.), 12 May, 1999 (12.05.99), whole document, p.5, lines 47-52 (Family: none)	1-4 5-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
13 October, 2000 (13.10.00)Date of mailing of the international search report  
17 October, 2000 (17.10.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05113

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim N .
X	JP, 2-96581, A (Shiseido Company, Limited. ), 09 April, 1990 (09.04.90), Table II	1,2
X Y	US, 5863748, A (New Life Science Products, Inc.), 26 January, 1999 (26.01.99), (Family: none)	1-4 5-12
X Y	WO, 95/31730, A1 (Microscreen Corp.), 23 November, 1995 (23.11.95), whole document, especially Example 6 & Example 8 & US, 5750357, A	1-4 5-12
X	EP, 11777, A1 (Hoffmann-La Roche, F., und Co. A.-G.), 11 June, 1980 (11.06.80) & US, 4245104, A	1,2
X Y	EP, 922715, A2 (Agency of Industrial Science and Technology MITI; Japan Chemical Innovation Institute), 16 June, 1999 (16.06.99) & JP, 11-171928, A2	1-4 5-12
Y	JP, 9-49830, A (Terumo Corporation), 18 February, 1997 (18.02.97) (Family: none)	5-12
Y	WO, 97/329, A (Yeda Research and Development Co., Ltd.), 03 January, 1997 (03.01.97) & EP, 871658, A & JP, 11-507920, A	5-12
Y	WO, 96/4402, A1 (The Regents of the University of California), 15 February, 1996 (15.02.96) & US, 5582985, A & JP, 10-503655, A & EP, 774013, A	5-12
PX	WO, 99/64378, A2 (Glycodesign Inc., Can.), 16 December, 1999 (16.12.99) & AU, 9944930, A	1,2

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C07D495/04, C08F20/54, C08F20/38, C12N11/08		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C07D495/04, C08F20/54, C08F20/38, C12N11/08		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Tarasow T. et. al., "Characteristics of an RNA Diels-Alderase Active Site.", J. Am. Chem. Soc., Vol. 121, No. 15 (1999年4月 科学技術振興事業団受け入れ) P. 3614-3617, Table 1 Substrate 9	1, 2
X	NELSON P. et. al., "Convenient preparation of new C-5 biotinylated dUTP derivative.", Nucleosides Nucleotides, Vol. 5, No. 3 (1986) P. 233-241, SCHEME I Substrate 3	1, 2
X Y	WO, 86/1899, A1 (Unilever PLC) 27. 3月. 1986 (27. 03. 86) whole document, especially P. 11, Lines 2-4 & EP, 178790, A1 & JP, 62-50019	1-4 5-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	13. 10. 00	国際調査報告の発送日 17.10.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 聖子 印	4C 9051
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	8, A	
X	EP, 226470, A2 (Unilever PLC) 24. 6月. 1987 (24. 06. 87) & JP, 62-1565	1-4
Y	61, A	5-12
X	EP, 914835, A2 (Alomone Labs Ltd.) 12. 5月. 1999 (12. 05. 99) Whole Do	1-4
Y	cument P. 5, Lines 47-52 (No Family)	5-12
X	JP, 2-96581, A (株式会社 資生堂) 9. 4月. 1990 (09. 04. 90) 表II	1, 2
X	US, 5863748, A (New Life Science Products, Inc.) 26. 1月. 1999 (26.	1-4
Y	01. 99) (No Family)	5-12
X	WO, 95/31730, A1 (Microscreen Corp.) 23. 11月. 1995 (23. 11. 95) Whole	1-4
Y	Document, especially Example 6 & Example 8 & US, 5750357, A	5-12
X	EP, 11777, A1 (Hoffmann-La Roche, F., und Co. A.-G.) 11. 6月. 1980	1, 2
	(11. 06. 80) & US, 4245104, A	
X	EP, 922715, A2 (Agency of Industrial Science and Technology MIT	1-4
Y	I; Japan Chemical Innovation Institute) 16. 6月. 1999 (16. 06. 99)	5-12
	& JP, 11-171928, A2	
Y	JP, 9-49830, A (テル株式会社) 18. 2月. 1997 (18. 02. 97) (ファミリーなし)	5-12
Y	WO, 97/329, A (イエダ リサーチ アンド デベロップメント カン	5-12
	パニー リミテッド) 3. 1月. 1997 (03. 01. 97) & EP, 871658, A & JP,	
	11-507920, A	
Y	WO, 96/4402, A1 (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オ	5-12
	ブ カリフォルニア) 15. 2月. 1996 (15. 02. 96) & US, 5582985, A & J	
	P, 10-503655, A & EP, 774013, A	
PX	WO, 99/64378, A2 (Glycodesign Inc., Can.) 16. 12月. 1999 (16. 12. 99)	1, 2
	& AU, 9944930, A	

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

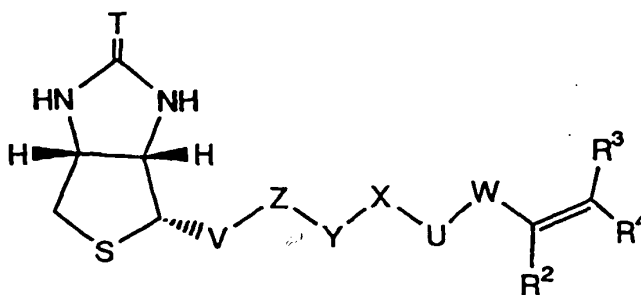


(43) 国際公開日  
2001年2月8日 (08.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/09141 A1

- (51) 国際特許分類: C07D 495/04, C08F 20/54, 20/38, C12N 11/08
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05113
- (22) 国際出願日: 2000年7月28日 (28.07.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/215667 1999年7月29日 (29.07.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 工業技術院長が代表する日本国 (JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-0013 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). 財団法人化学技術戦略推進機構 (JAPAN CHEMICAL INNOVATION INSTITUTE) [JP/JP]; 〒111-0052 東京都台東区柳橋二丁目22番13号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小栗昌平, 外 (OGURI, Shohei et al.); 〒107-6028 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (54) Title: POLYMERIZABLE BIOTIN DERIVATIVES, BIOTIN POLYMER, AND POLYMER RESPONSIVE TO AVIDIN STIMULATION
- (54) 発明の名称: 重合性ビオチン誘導体、ビオチン高分子化合物及びアビジン刺激応答性高分子化合物



(57) Abstract: Novel polymerizable biotin derivatives which are represented by general formula (I). A polyfunctional polymer can be synthesized therefrom. In formula (I), R<sup>2</sup> represents hydrogen or alkyl; R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> each represents hydrogen, alkyl, or aryl; T represents oxygen or =NH; W represents a single bond, carbonyl, thiocarbonyl, or C<sub>1-3</sub> alkylene; U represents a single bond or -NH-; X represents a single bond, a C<sub>1-3</sub> hydrocarbon bond, oxygen, or -NH-; Y represents a single bond, carbonyl, thiocarbonyl, -NH-, 1,2-dioxyethylene, or 1,2-diaminoethylene; Z represents a single bond, carbonyl, thiocarbonyl, C<sub>1-3</sub> alkylene, oxygen, or -NH-; and V represents a single bond or C<sub>1-3</sub> alkylene.

[続葉有]

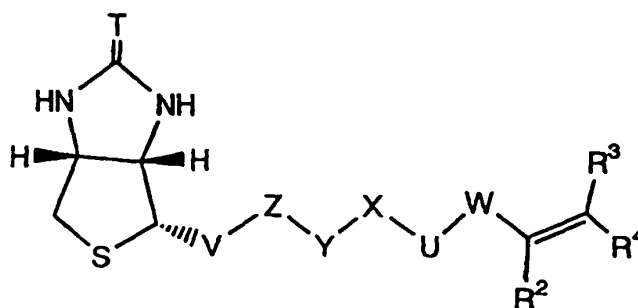
WO 01/09141 A1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(57) 要約:

下記一般式 (I) で表される新規重合性ビオチン誘導体を得、これを用いて多官能性、多重機能性の高分子を合成、設計可能とする。

一般式 (I)



式 (I) 中、 $R^2$  は水素原子又はアルキル基、 $R^3$  及び  $R^4$  はそれぞれ水素原子、アルキル基又はアリール基、 $T$  は酸素原子又は  $=NH$  基、 $W$  は単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基もしくは炭素数 1～5 のアルキレン基、 $U$  は単結合又は  $-NH-$  基、 $X$  は単結合又は炭素数 1～8 の炭化水素結合、酸素原子もしくは  $-NH-$  基、 $Y$  は単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基、 $-NH-$  基、1, 2-ジオキシエチレン基もしくは 1, 2-ジアミノエチレン基、 $Z$  は単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基、炭素数 1～5 のアルキレン基、酸素原子もしくは  $-NH-$  基、 $V$  は単結合又は炭素数 1～5 のアルキレン基を示す。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N .

PCT/JP00/05113

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07D495/04, C08F20/54, C08F20/38, C12N11/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07D495/04, C08F20/54, C08F20/38, C12N11/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tarasow T. et al., "Characteristics of an RNA Diels-Alderase Active Site.", J. Am. Chem. Soc., Vol.121, No.15 (received at Japan Science and Technology Corp., in April 1999) pp.3614-3617, Table 1 Substrate 9	1, 2
X	NELSON P. et al., "Convenient preparation of new C-5 biotinylated dUTP derivative.", Nucleosides Nucleotides, Vol.5, No.3 (1986) pp.233-241, SCHEME I Substrate 3	1, 2
X Y	WO, 86/1899, A1 (Unilever PLC), 27 March, 1986 (27.03.86), whole document, especially p.11, lines 2-4 & EP, 178790, A1 & JP, 62-500198, A	1-4 5-12
X Y	EP, 226470, A2 (Unilever PLC), 24 June, 1987 (24.06.87) & JP, 62-156561, A	1-4 5-12
X Y	EP, 914835, A2 (Alomone Labs Ltd.), 12 May, 1999 (12.05.99), whole document, p.5, lines 47-52 (Family: none)	1-4 5-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
13 October, 2000 (13.10.00)Date of mailing of the international search report  
17 October, 2000 (17.10.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05113

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 2-96581, A (Shiseido Company, Limited. ), 09 April, 1990 (09.04.90), Table II	1,2
X Y	US, 5863748, A (New Life Science Products, Inc.), 26 January, 1999 (26.01.99), (Family: none)	1-4 5-12
X Y	WO, 95/31730, A1 (Microscreen Corp.), 23 November, 1995 (23.11.95), whole document, especially Example 6 & Example 8 & US, 5750357, A	1-4 5-12
X	EP, 11777, A1 (Hoffmann-La Roche, F., und Co. A.-G.), 11 June, 1980 (11.06.80) & US, 4245104, A	1,2
X Y	EP, 922715, A2 (Agency of Industrial Science and Technology MITI; Japan Chemical Innovation Institute), 16 June, 1999 (16.06.99) & JP, 11-171928, A2	1-4 5-12
Y	JP, 9-49830, A (Terumo Corporation), 18 February, 1997 (18.02.97) (Family: none)	5-12
Y	WO, 97/329, A (Yeda Research and Development Co., Ltd.), 03 January, 1997 (03.01.97) & EP, 871658, A & JP, 11-507920, A	5-12
Y	WO, 96/4402, A1 (The Regents of the University of California), 15 February, 1996 (15.02.96) & US, 5582985, A & JP, 10-503655, A & EP, 774013, A	5-12
PX	WO, 99/64378, A2 (Glycodesign Inc., Can.), 16 December, 1999 (16.12.99) & AU, 9944930, A	1,2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**